Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
Freie Universität Berlin
1000 Berlin 33, Arnimallee 22

Untersuchungen über die Wirkungen von Parathyrin und Dibutyryl-cyclischem 3'-5'-Adenosin-monophosphat auf die Aktivität von Carboanhydrase in Wachstumszonen von Knochen

INAUGURAL–DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Margret-Annette Gamer
aus Detmold

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544721_0040

Aus dem INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE UND BIOCHEMIE,
FREIE UNIVERSITÄT BERLIN,
1000 Berlin 33, Arnimallee 22

Untersuchungen über die Wirkungen von Parathyrin und Dibutyryl-cyclischem 3' - 5' - Adenosin-monophosphat auf die Aktivität von Carboanhydrase in Wachstumszonen von Knochen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Margret-Annette Gamer
aus Detmold

Referent: Professor Dr. rer. nat. Peter Siegmund
Koreferent: Professor Dr. H. J. Dulce

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 22. 12. 1978

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Peter Siegmund im Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin angefertigt.

Herrn Professor Dr. Peter Siegmund gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und die Unterstützung und Förderung dieser Arbeit. Seine Ratschläge waren mir eine wertvolle Hilfe.

Herrn Dr. Peter Dietsch möchte ich für seine Hilfsbereitschaft - besonders bei der Abfassung der Arbeit - danken.

Fräulein Petra Ott und Fräulein Renate Günter danke ich für technische Assistenz.

INHALTSVERZEICHNIS Seite

1.	Einleitung	5
1.1	Carboanhydrase	8
1.2	Carboanhydrase, Parathyrin, 3',5'-Adenosinmonophosphat cycl.	11
1.3	Modelle der Übertragung hormonaler Impulse auf den intracellulären Raum	15
1.3.1	Das "2nd-messenger-model" nach Sutherland und Robinson	15
1.3.2	Modell nach Rasmussen	16
2.	Ziel der Arbeit - Aufgabenstellung - Fragestellung	20
3.	Meßergebnisse - Diagramme - Diskussion	21
3.1	Diagramme	30
3.2	Tabellen	33
4.	Arbeitsmethoden	39
4.1	Vorbehandlung der Versuchstiere	39
4.2	Aufarbeitung der Wachstumszonen	41
4.3	Bestimmung der Carboanhydrase-Aktivität	42
4.4	DNA-Bestimmung	45
4.4.1	Fluorimetrische Methode nach J.B. Le Pecq, modifiziert	45
4.4.2	Methode nach Schmidt, Tannhauser und Schneider, modifiziert nach Volklin und Cohn (1957)	48
4.5	Bestimmung des Blutgehaltes der Probe und Blutkorrektur für Carboanhydrase-Gehalt (Holzer, Seidlmeyer und Kiese (1956) mod.)	50
4.6	Bestimmung der Serum-Calcium-Konzentration	52
4.7	Zentralwert und Signifikanzberechnungen	54
5.	Zusammenfassung	56
6.	Literaturverzeichnis	57
	Lebenslauf	66

1. EINLEITUNG

Die frühen Untersuchungen am Knochensystem und dessen Erkrankungen wurden vorwiegend von Anatomen betrieben, die sich zumeist auf eine reine Beschreibung morphologischer Veränderungen am Knochen selbst beschränken mußten. Ihre Untersuchungsmethodik entsprach dem damaligen Wissensstand, den damaligen experimentellen Möglichkeiten und einer vorwiegend "passiven" Art des Experimentierens, nämlich: der Beobachtung nur vorgegebener pathologischer Funktionszustände. Naturgemäß lagen darin wenig Möglichkeiten, Aussagen über pathologische Hintergründe zu machen.

Neue Aspekte boten sich mit der Entdeckung des Parathyrins im Jahre 1925 an. Es war damit eine Substanz gefunden worden, die es ermöglichte, in sehr wirksamer Weise in den Knochenstoffwechsel und speziell den Ca-Stoffwechsel einzugreifen.

Hiermit war es zugleich möglich geworden, eine neue "aktive" Art des Experimentierens einzuführen, nämlich:
durch Stimulierung oder Inhibierung bewußt herbeigeführter Funktionsabweichungen ursächlicher Zusammenhänge im Laboratoriumsversuch qualitativ und quantitativ zu verfolgen und zu analysieren.

Der durch die Entdeckung des Paratyrins ausgelöste Wandel in der Untersuchungsmethodik ist deutlich:
"aktives Befragen" ist an die Stelle bzw. neben das "passive Beobachten" getreten.

Pathologische Veränderungen am Skelettsystem untersuchte schon Howship (1820). Er beschrieb die sogenannten "Resorptionslakunen". Robin (1849, 1864) unterschied "Myeloplaxes" von "Karyozyten", während Loven (1863) beobachtete, daß das den Resorptionsflächen angrenzende Gewebe den Knochen auflöse. Kölliker (1873) beschrieb osteolytische Riesenzellen, die er "Osteoklasten" nannte. Er war der Meinung, daß diese Osteoklasten den Knochen von der Markhöhle her, mit chemischen Mitteln noch unbekannter Natur, aufzulösen vermögen.

Arey (1920) gab eine Zusammenfassung des damaligen Wissensstandes über Osteoklasten, deren Herkunft, Wirkungsweise, Abbau und Knochenresorption. Nach der damals herrschenden Auffassung wurde in der Knochenresorption ein Vorgang rein chemischer Natur vermutet,und am Mechanismus der Osteolyse sollte eine Säure beteiligt sein. Jedoch vermutete Arey bereits damals, daß auch ein Enzym mitbeteiligt sei.
Weidenreich (1930) sprach sich für die Sekretion eines proteolytischen Enzyms und einer Säure durch Knochenzellen aus.
Barnicot (1948) und Hancox, Bourne (1956) entdeckten im Zellinnern von Osteoklasten große randständige Vakuolen und deuteten diese als Folge einer Sekretionstätigkeit.
Cretin (1951) beobachtete an Schnitten in der Nähe der Osteoklasten Indikatorfarbumschläge zur sauren Seite hin und führte dieses auf die Wirkung einer Säuresekretion zurück. Jedoch als schlüssiger Beweis einer Säurekonzentration konnte dieser Befund nicht gelten, da - wie von anderer Seite schon bemerkt worden war - außer Wasserstoffionenkonzentrationsänderungen auch Veränderungen in den Gewebsstrukturen und Salzkonzentrationen Indikatorfarbumschläge verursachen können.
Mc Lean (1954) verwarf die Wasserstoffionen-Sekretionstheorie und setzte an deren Stelle einen anderen Wirkungsmechanismus: danach sollte die Wirkung der Osteoklasten auf der Bildung von Calciumkomplexverbindungen beruhen.
1960 fanden Siegmund und Dulce sowie Dulce, Siegmund, Körber, Schütte heraus, daß bei der Demineralisation H^+-Ionen und ein bisher noch nicht genauer definiertes Enzym eine entscheidende Rolle spielen. Im Zusammenhang mit ebenfalls nachgewiesenen spezifischen Hydrolasen sind also für die Knochenauflösung H^+-Ionen und ein zugleich wirksames Enzym verantwortlich zu machen. Es gelang diesen Autoren außerdem, die Natur dieses Enzyms zu charakterisieren:
der von Arey schon 1920 postulierte Wirkungsmechanismus der Osteolyse, gesehen im Zusammenhang mit einer Säuresekretion in den Osteoklasten, stellte sich nach wie vor als einfachster aller Mechanismen dar.

Es gibt anderen Ortes im Organismus Zellen mit speziellen Funktionen, die die Fähigkeit besitzen, Wasserstoffionen zu produzieren und zu sezernieren. Hierzu gehören z.B. die Belegzellen der Magenschleimhaut (Davenport 1939, 1940), ferner die Tubuluszellen der Niere (Davenport, Wilhelmi, 1941, 1942).
Analoge Fähigkeiten konnten nunmehr auch für die Osteoklasten postuliert werden.
Eine wichtige Methode, die diese Vermutung überprüfbar machte, kam von Berliner, Kennedy, Orlof (1951) und Janowitz, Colcher, Hollander (1952): diese hatten beobachtet, daß, sowohl im Magen als auch in den Nieren, die Wasserstoffionensekretion durch "Diamox" (Acetazolamid) inhibierbar ist. Diese Substanz aber war bekannt als spezifischer Inhibitor des Enzyms Carboanhydrase.

Der lang gesuchte kausale Zusammenhang zwischen "Säure-Sekretion" und "Enzym-Wirkung" bot sich in einer solchen logischen Kette als notwendige Folge an.

In einer ersten Arbeit unter dem Titel "Zur Biochemie der Knochenauflösung I" konnten Siegmund und Dulce (1960) zeigen, daß nach Applikation des Carboanhydrase-Inhibitors Acetazolamid bei Legehennen die Plasmacalciumwerte signifikant gesenkt werden. Aus diesem Befund konnten Hinweise entnommen werden über einen möglichen Zusammenhang zwischen Knochenresorption und Säure-Sekretion.

Da bei Wirbeltieren eine Wasserstoffionensekretion offensichtlich durch Zellen oder in Zellen erfolgt, in denen auch gleichzeitig Carboanhydrase vorkommt (Belegzellen der Magenschleimhaut und Tubuluszellen der Niere), versuchten obige Autoren mit Erfolg, Carboanhydrase auch in Knochen nachzuweisen. Die Aktivität des Enzyms im Knochen - und zwar in der osteoklastenreichen Zone der Epiphyse - entsprach größenordnungsmäßig der Aktivität in der Niere, bezogen auf DNA.

1.1 Carboanhydrase (Carbonat-Hydro-Lyase, EC 4.2.1.1)

Die Carboanhydrase ist ein intrazelluläres Enzym, welches erstmalig von Meldroum und Roughton (1933) aus Erythrozyten isoliert und in seinen Eigenschaften beschrieben wurde.

Carboanhydrase ist ein Metallo-Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 30 000 und enthält in seinem aktiven Zentrum ein Zink-Atom. Es katalysiert die folgende reversible Reaktion:

$$H_2O + CO_2 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$
$$\rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons$$

Da aber im Gleichgewicht das Verhältnis von H_2CO_3 : CO_2 sehr klein ist, kann H_2CO_3 vernachlässigt werden und die resultierende "Über-Alles"-Reaktion läßt sich vereinfacht schreiben:

$$H_2O + CO_2 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

Diese Reaktion läuft auch spontan, d.h. auch ohne katalysierendes Enzym, ziemlich rasch ab.

Nach Coleman (1967) sind bisher sieben Metallo-Carboanhydrasen bekannt, die alle das Metall-Ion an derselben Bindungsstelle haben; es sind dieses:

Mn (II), Co (II), Ni (II), Cu (II), Zn (II), Cd (II), Hg (II).

Und von diesen Metallo-Carboanhydrase-Enzym-Typen hat nur das

Zn(II)-Enzym

physiologische Bedeutung, und nur dieses kommt natürlich vor; alle anderen sind künstlich synthetisiert worden.

Aus obiger Enzym-Reihe haben nur das Zn(II) und das Co(II) die Fähigkeit, die CO_2-Hydratationsreaktion zu katalysieren.

Ebenso besitzen nur das Zn(II) und das Co(II) die Fähigkeit, eine metall-ionen-abhängige Bindung von Acetazolamid am

aktiven Zentrum des Enzyms einzugehen.
Um die Bindung am aktiven Zentrum des Enzym-Moleküls konkurrieren mit dem Acetazolamid auch: Chlorid, Sulfat, Acetat, Azid, Cyanid, Cyanat-Ionen u.a.

Die Eigenschaften hochgereinigter Enzyme und die Existenz verschiedener Iso-Enzyme sind inzwischen in zahlreichen Laboratorien nachgewiesen worden, u.a. durch Dietsch (1974), Holke (1974); ferner die Hemmbarkeit der Aktivität durch eine Vielzahl von Sulfonamiden.

Drei verschiedene Reaktionstypen, katalysierbar durch Carboanhydrase, lassen sich unterscheiden:

1) die Hydratationsreaktion von CO_2, katalysiert durch das Zn(II)- bzw. Co(II)-Enzym; diese Reaktion kann in beiden Richtungen verlaufen.
2) die Hydratisierung von Aldehyden: Pocker, Meany (1965); auch diese Reaktion kann in der Gegenrichtung verlaufen.
3) die Hydrolyse von Estern: Tashian, Plato, Shows (1963).

Carboanhydrase wurde erstmalig in Erythrozyten nachgewiesen, später auch in den Belegzellen der Magenschleimhaut, den Tubuluszellen der Niere und in Knochen - hier jedoch nur in den Wachstumszonen und im Trabekularknochen der Metaphyse, nicht hingegen im Knorpel.

Meldroum, Roughton (1933) untersuchten die Carboanhydrase und ihre physiologische Bedeutung in den Erythrozyten. Dort wird etwa 2/3 der Kohlensäure in Bicarbonat umgewandelt. In der Lunge kann beim Durchfluß des Blutes durch die Lungenkapillaren nach pH-Erniedrigung durch Oxygenierung von Hämoglobin unter der Mitwirkung von Carboanhydrase eine schnelle Abgabe von CO_2 aus dem Blut in die Alveolaren vonstatten gehen; aber auch ein Prozeß in umgekehrter Richtung kann ablaufen: unter CO_2-Aufnahme aus dem Gewebe in die Erythrozyten, im Austausch gegen O_2.

Bei der geringen Verweildauer des Blutes in der Lunge würde bei einer nur spontanen - also nicht katalysierten Reaktion - die Reaktionsgeschwindigkeit für die H_2CO_3-Dehydratisierung und somit für die CO_2-Austauschbarkeit nicht ausreichen.

Davenport und Fischer (1939) fanden Carboanhydrase erstmalig auch in den Belegzellen der Magenschleimhaut. Sie fanden dort eine fünffach höhere Enzym-Konzentration, als für Erythrozyten angegeben worden war. Die Autoren sahen hier die physiologische Bedeutung der Carboanhydrase in einer besonderen Schutzfunktion für die Zellen vor zu starker Alkalisierung, die bei der Säure-Sekretion in den Belegzellen der Magenschleimhaut eintreten würde.

Die Carboanhydrase sorgt für eine schnelle CO_2-Hydratisierung, bei welcher die zu den sezernierten H^+-Ionen in äquivalenter Menge anfallenden Hydroxyl-Ionen sofort neutralisiert werden können: Feldberg et al. (1940).

Davenport und Wilhelmi (1941) gelang der Nachweis von Carboanhydrase in den Nieren. Versuche an isolierten Froschnieren ergaben, daß nach Applikation von Carboanhydrase-hemmenden Sulfonamiden die Bildung eines sauren Harns verhindert wurde: Höber (1942).

Hiermit erklärte man die pH-Werterniedrigung des Harns in den Nierentubuli: Pitts, Alexander (1945).

In den Nierentubuli findet ein Austausch von tubulären Na^+-Ionen gegen zelluläre H^+-Ionen statt; die Carboanhydrase sorgt für eine schnelle Wasserstoffionen-Nachlieferung und pH-Wertkonstanz in der Zelle.

Mueller (1973) wies mit autoradiographischen Methoden nach, daß Carboanhydrase sich in den Osteoklasten junger Knochen in ähnlich hoher Konzentration vorfindet wie in den acinären Zellen des Pankreas.

Die Carboanhydrase wurde mit markiertem $[H^3]$ Acetazolamid inhibiert und markiert; Carboanhydrase ließ sich nicht in Osteoblasten und Osteozyten nachweisen.

Pochhammer (Dietsch, Holke, Pochhammer, Siegmund (1976) und Pochhammer, Gamer, Dietsch, Siegmund (1976)) wies fluorescenz-mikroskopisch durch Anfärben mit Dansylamid (Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonamid) - Carboanhydrase bildet mit Dansylamid einen stark fluorescierenden Komplex - Carboanhydrase im Zytoplasma der vielkernigen Osteoklasten in Knochen nach.

Dulce, Siegmund, Körber und Schütte ("Zur Biochemie der Knochenauflösung III" (1960)) fanden Carboanhydrase-Aktivität auch in Homogenaten von Knochen. Sie deuteten diesen Befund als Hinweis dafür, daß Carboanhydrase in den Vorgang der Osteolyse mit einbezogen ist im Sinne einer H^+-Produktion in den Osteoklasten.

Vergleiche auch Körber (1964).

1.2 Carboanhydrase, Parathyrin, 3', 5'-Adenosinmonophosphat cycl.

Der Nachweis der Carboanhydrase in Knochen und der Zusammenhang zwischen Carboanhydrase-Aktivität und Wasserstoffionenproduktion, also einer enzymatisch bedingten Säure-Produktion, hatte zu der naheliegenden Gedankenverbindung geführt, daß die Carboanhydrase-Aktivität auch mit Demineralisationsvorgängen im Knochensystem im Zusammenhang stehen müßte.

Andererseits mußte auch dem Parathyrin schon von Anfang an die zunächst nur hypothetische Möglichkeit zugeschrieben werden, daß auch diese Substanz an Knochen-Auflösungsvorgängen irgendwie beteiligt sein müßte. So stellte Collip (1925) aus Rindenepithelkörperchen Parathyrin-haltige Extrakte her und beobachtete nach Injektion einen Anstieg des Serum-Calcium-Spiegels.

Für eine wohlbegründete Hypothese fehlten zwar noch genauere, beweisende Zusammenhänge, wenngleich auch in dieser Hinsicht schon sehr früh Davenport (1940) und etwas später Hoffmeister und Krück (1954) richtungsgebende Hinweise anboten. Diese Autoren hatten beobachtet, daß die Säure-Sekretion der Magenschleimhaut sowie die Säuerung des Harns durch Thiocyanat-Injektion verhindert werden konnten.

Dabei waren vom Thiocyanat (CNS) sowohl eine direkt hemmende Wirkung auf die H^+-Ionen-Sezernierung als auch eine Carboanhydrase-inhibierende Wirkung bekannt. Analoge Effekte mußten folglich auch mit anderen Carboanhydrase-Inhibitoren zu erzielen sein.

Bauditz und Siegmund (1960) beobachteten zunächst ebenfalls noch mit dem Carboanhydrase-Inhibitor Thiocyanat, daß dieser den Plasma-Calcium-Anstieg nach Parathyrin zu hemmen vermochte; das Interessante an diesem Befund war, daß Thiocyanat nicht nur hemmend auf die Säure-Sekretion, sondern gleichzeitig hemmend auch auf den Plasma-Calcium-Anstieg wirkte. Die vermutete Gleichsinnigkeit der Wirkungen von Enzym (Carboanhydrase), Säureproduktion und Knochenauflösung war also damit bestätigt.

Siegmund, Dulce (1960): "Zur Biochemie der Knochenauflösung I",benutzten als Carboanhydrase-Inhibitor Acetazolamid und konnten damit an Legehennen die Plasma-Calcium-Werte signifikant senken.

Dulce und Siegmund (1960): "Zur Biochemie der Knochenauflösung II", konnten in dieser zweiten Arbeit zeigen, daß Acetazolamid - an Hähnchen - die Plasma-Calcium-Werte auch dann senkt, wenn die vorangegangene Hypercalciämie von dem Hormon Östron verursacht worden war.

Siegmund und Bauditz (1965) zeigten, daß intravenöse Gaben des Carboanhydrase-Inhibitors Acetazolamid auch den durch Injektionen von Parathyrin bewirkten Plasma-Calcium-Anstieg zu hemmen vermochten.

Da also Acetazolamid sowohl die Carboanhydrase inhibieren als auch die Wirkung von Parathyrin auf den intakten Organismus zu unterbinden vermag, kann somit wohl mit guter Berechtigung ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Enzym-Wirkung der Carboanhydrase und der Parathyrin-Wirkung postuliert werden.

Waite, Volkert und Kenny (1970) kommen im Endergebnis ihrer Untersuchungen zur selben Schlußfolgerung, obwohl der Ausgangspunkt ihrer Arbeit ein anderer war.

In einer vorangegangenen Arbeit hatten Stahl und Kenny (1969) gefunden, daß Acetazolamid in akut nephrektomierten Ratten eine hypocalciämische Antwort auslöst, wobei ungeklärt geblieben war, warum eine solche Antwort nur in nephrektomierten, nicht aber in Tieren mit intakten Nieren ausgelöst wurde. Die Autoren konnten hierauf eine schlüssige Antwort geben unter Hinweis auf die Existenz zweier verschiedener Calcium-pools: Talmage und Elliot (1958) sowie Johnston und Deiss (1966) hatten mit Hilfe radioaktivmarkiertem ^{45}Ca gezeigt, daß je nach der Art der Verabreichung "akut" oder "chronisch", analog ein "akuter" und ein "chronischer" Calcium-pool notwendig zu unterscheiden seien.

Auch Waite, Volkert und Kenny experimentierten mit radioaktiv markiertem ^{45}Ca und fanden,
daß Acetazolamid keinerlei Effekt zeigte auf den totalen Calciumspiegel an intakten Ratten,
hingegen der totale Ca-Spiegel an nephrektomierten Ratten um ca. 7 % abnahm,
daß jedoch die Antwort des radioaktiven Calciums genau umgekehrt ausfiel. Das ^{45}Ca zeigte an intakten Ratten auf Acetazolamidgabe hin im Plasma eine ca. 10 %ige Zunahme und an nephrektomierten Tieren keine signifikante Änderung.
Die Deutung ist, schlüssig, die:
An intakten Tieren treten zwei Effekte auf, die sich gegenseitig aufheben, d.h. der totale Ca-Spiegel bleibt unberührt und stammt aus dem "akuten" Ca-pool.
Nephrektomie beseitigt die Einwirkungsmöglichkeit auf den "akuten" pool.

Zugleich war damit gezeigt worden, daß am lebenden Organismus zeitlich sich relativ schnell einstellende Gegen-Regulationsmechanismen gewisse Meßergebnisse unkontrolliert verändern und zu Fehldeutungen Anlaß geben können. Um solchen und eventuellen weiteren Komplikationen aus dem Wege zu gehen, schien es angezeigt, störende Drüsensysteme zu ektomieren.

Waite, Volkert und Kenny (1970) benutzten deshalb für ihre weiteren Versuche nur noch parathyroidektomierte und nephrektomierte Ratten. Sie fanden, daß sowohl Parathyrin als auch Dibutyryl-cycl.-3',5'-Adenosinmonophosphat (DBcAMP) jeweils für sich eine signifikante hypercalciämische Antwort induzierten. Wird hingegen, jeweils zur gleichen Zeit, Acetazolamid dazu injiziert, wird damit die hypercalciämische Antwort unterbunden.

An diesen Versuchen von Kenny und Mitarbeitern scheint interessant, daß an sich bekannte Einsichten und Vermutungen hier nochmals und auf einem anderen Wege recht beweiskräftig bestätigt werden konnten und im Endergebnis die Hypothese stützen.

> Acetazolamid blockiert die hypercalciämische Antwort auf Parathyrin und auf DBcAMP.
>
> Die Eigenschaft, die für Acetazolamid bestimmend ist, liegt eben in der Fähigkeit, Carboanhydrase zu inhibieren.
>
> Acetazolamid blockiert die Knochen-Resorption durch eine Hemmung der Carboanhydrase-Wirkung.

Im selben Sinne sind auch neuere Untersuchungen zu deuten:

Minkin und Jennings (1972) konnten zeigen, daß eine Parathyrin-induzierte Knochenresorption durch Sulfonamid-Gaben unterbunden werden konnte und dieser Effekt sich auch in vitro reproduzieren ließ.

Holke und Siegmund (1971) und Holke, Diss. Berlin (1974) beobachteten einen signifikanten Anstieg der Carboanhydrase-Aktivität in Nieren von Ratten und Hühnern nach Parathyrin-Injektionen.

1.3 Modelle der Übertragung hormonaler Impulse auf den intracellulären Raum

1.3.1 Das "2nd-messenger-model" nach Sutherland und Robinson

Nachdem Lipkin et al. (1959) die Struktur des cyclischen Adenosin-mono-phosphats, einer Substanz, der eine Mittlerrolle zwischen den einwirkenden Hormonen und den intrazellulären Enzymsystemen zugeschrieben wurde, aufklären konnten, formulierten Sutherland und Robinson (1966) ihr sogenanntes "2nd-messenger-model". Dieses ist ein Schema, welches für die Wirksamkeit zahlreicher Peptid-Hormone und biogener Amine Gültigkeit haben soll:

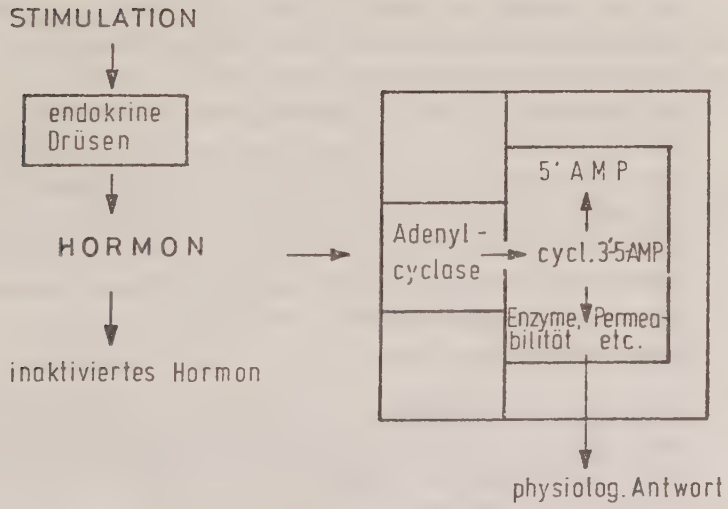


Fig. 1: "2nd-messenger-model" nach Sutherland und Robinson

Von einem sogenannten "1^{rst}-messenger", also einem ersten Informationsträger, einem Polypeptid-Hormon oder einem biogenen Amin, wird über einen spezifischen Rezeptor an der Zell-Membran ein hormonaler Impuls zur Bildung eines zweiten Informationsträgers, des sogenannten "2nd-messenger" benutzt. Die Rolle dieses zweiten intrazellulären Informationsträgers wird dem cAMP zugeschrieben; diese Substanz hat die Aufgabe, als eine Art unspezifischer Bote eine spezifische Zell-Antwort über die Aktivierung der entsprechenden Enzymsysteme in Gang zu setzen bzw. zu induzieren.

1.3.2 Modell nach Rasmussen

Rasmussen: "Hormonal Control of Skeletal and Mineral Homeostasis" et al.(1974)

In diesem Modell werden die antagonistisch wirkenden Hormone, das Hormon der Nebenschilddrüse, das Parathyrin und das calciumwirksame Hormon der C-Zellen der Schilddrüse, das Calcitonin berücksichtigt.
Dem Parathyrin wird eine osteolytische, Serum-Calcium-steigernde Wirkung zugeschrieben, dem Calcitonin hingegen eine osteoblastische, Calcium-senkende Wirkung. Obwohl Parathyrin und Calcitonin calciumstoffwechsel-spezifisch gegensätzliche Auswirkungen haben, ist ihre Wirkung auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration synergistisch: d.h. beide Hormone erhöhen die cAMP-Konzentration über Aktivierung einer membran-ständigen Adenylat-Cyclase.

Schematisch veranschaulicht wird dieses Modell an einer Zelle des proximalen Tubulus. Die Wirkung einer Stimulation durch Parathyrin bzw. Calcitonin kann etwa folgendermaßen beschrieben werden:

Beide Hormone aktivieren die membran-ständige Adenylat-cyclase, was zu einer intracellulären Erhöhung der cAMP-Konzentration führt mit nachfolgenden Veränderungen an der luminalen Zell-Membran. Es kommt dann in der weiteren Folge zur Reabsorption von Ionen des Calciums, Natriums und Mono-

Hydrogen-Phosphats, wobei Calcitonin den Ca^{++}-Ausfluß zum intratubulären Raum begünstigt und entweder die Eintrittsrate in die Zelle oder in die Mitochondrien auch für HPO_4^{--} begünstigt. Parathyrin hingegen verhindert den Ca^{++}-Austausch vom Cytosol in den tubulären Raum.

Die vom Parathyrin verursachte cAMP-Konzentrationszunahme stimuliert den Calcium-Austritt aus den Mitochondrien, was einen Anstieg der Calcium-Konzentration im Cytosol zur Folge hat; hierdurch wiederum werden Enzym-Aktivitäten in der Zelle beeinflußt.

Die Erhaltung der physiologischen Funktionen ist demnach gebunden an die Konstanz der Calcium-Ionen-Konzentration im EZR,und zwar in demselben Maße wie auch die normale Zellfunktion an die Konstanz der Calcium-Ionen-Konzentration gebunden ist (Rasmussen).

Die gesteuerten Veränderungen des Calcium-Ionen-Gehaltes des Cytosols dienen dazu, die Aktivität der Zelle, entsprechend dem externen Stimulator, zu verändern: Rasmussen (1971), Borle (1971).

Die Calcium-Konzentrationen im Cytosol werden durch Vorgänge an mindestens zwei Membranen gesteuert, nämlich:

an der Mitochondrial-Membran und
an der Cytoplasma-Membran.

Für beide Seiten wird ein aktiver Transport aus dem Cytosol in die Mitochondrien bzw. in den EZR verantwortlich gemacht. In den Mitochondrien wird das Calcium vermutlich als tertiäres Ca-Phosphat gespeichert gemäß der Reaktionsgleichung:

$$3\ Ca^{++} + 2\ HPO_4^{--} = Ca_3(PO_4)_2 + 2\ H^+$$

d.h.: unter Freisetzung von Wasserstoff-Ionen.
Es spielen somit auch die Phosphat-Ionen-Konzentration und der pH-Wert eine Rolle in der Calcium-Ionen-Verteilung.

Als Haupt-"pool" für das Zell-Calcium sind die Mitochondrien anzusehen; ihr Calcium-Phosphat steht in einem sich zeitlich

relativ rasch einstellenden Gleichgewicht bzw. Austauschverhältnis mit dem EZR via Cytosol.

Im Sinne Rasmussens ist zwischen einem sich rasch einstellenden Gleichgewicht und einem sich sehr viel langsamer einstellenden Gleichgewicht zu unterscheiden; dementsprechend ist zu differenzieren zwischen einem

"Cell-Calcium-pool" einer relativ raschen Mineral-Homeostasis

und einem

"Haupt-Calcium-pool" - dem sog. "Skelett-pool" der relativ langsamen "Skelett-Homeostasis".

Im Rasmussenschen Modell wird der Versuch unternommen, die intrazellulären Wirkungen aus einem einheitlichen, umfassenden Konzept heraus zu verstehen. Er ist in diesem Bemühen zu der Auffassung gelangt, daß nicht nur dem cAMP, sondern auch den Ca^{++}-Ionen und den Phosphat-Ionen (HPO_4^{--}) die Funktion zellulärer "2^{nd}-messenger" zugeschrieben werden müßte, da jede dieser Substanzen durch ihre Verteilung und Konzentration die beiden anderen mitbeeinflußt. Alle drei Wirkungskomponenten werden durch extrazelluläre Faktoren gesteuert, z.B.:

Parathyrin, Calcitonin, 1,25-$(OH)_2$-Calciferol u.a.

Wie für die intrazellulären Faktoren, so wird auch für die EZF eine Wechselwirkung postuliert:

Parathyrin steuert in der Niere die Konversion von 25-(OH)-Calciferol 1,25-$(OH)_2$-Calciferol,

das 1,25-$(OH)_2$-Calciferol übt eine Regelfunktion auf die Osteoblasten aus.

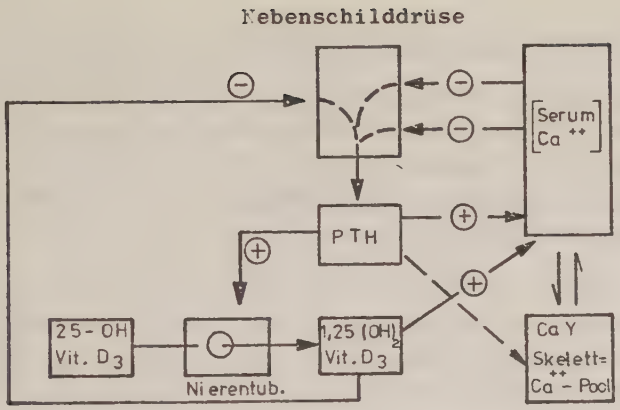


Fig. 2: Rasmussens Modell einer Rückkopplungsbeziehung zwischen Parathyrin und Serum-Calcium, zwischen Parathyrin-Sekretion und 1,25-$(OH)_2$-Calciferol-Synthese: Parathyrin-Sekretion gesteuert durch Ca^{++} und 1,25-$(OH)_2$Calciferol.
- PTH bedeutet Parathyrin. -

2. ZIEL DER ARBEIT - AUFGABENSTELLUNG - FRAGESTELLUNG

Das Hormon der Nebenschilddrüse, das sogenannte Parathyrin, ist der Stimulator einer Reaktionsreihe, in welcher nicht nur der Serum-Calcium-Spiegel ansteigt, sondern auch das intrazelluläre Enzym, die Carboanhydrase, in ihrer Aktivität in der Niere angehoben wird: Holke, Diss. Berlin (1974).

Auch Knochen sind ein Erfolgsorgan des Parathyrins: auch in Knochen ist Carboanhydrase-Aktivität nachgewiesen worden, und da fernerhin, von sehr verschiedenen Autoren übereinstimmend, ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Parathyrin-Wirkung und Carboanhydrase-Aktivität postuliert worden ist, liegt es nahe, die Frage näher zu untersuchen,

> hat Parathyrin die Fähigkeit, auch in Knochen die Carboanhydrase-Aktivität zu erhöhen?

Da - nach den Ergebnissen von Waite, Volkert und Kenny (1970) - auch DBcAMP das N^6-2'-O-Dibutyryl-Derivat des Cyclo-3',5'-Adenosinmonophosphats (cAMP) eine zum Parathyrin parallel verlaufende Anhebung des Plasma-Calciums zu stimulieren vermag, ist auch die folgende Frage eine sehr naheliegende,

> hat auch DBcAMP die Fähigkeit, in Knochen eine Carboanhydrase-Aktivität zu stimulieren?

Nach Chase und Aurbach (1967) und Wells und Lloyd (1968, 1969) wird nach Parathyrin-Injektion ein intrazellulärer cAMP-Anstieg beobachtet.

DBcAMP und cAMP unterscheiden sich physiologisch dadurch, daß DBcAMP eine höhere Permeabilität für Zellmembranen besitzt und widerstandsfähiger ist gegen 3',5'-Nukleotid-Phosphodiesterasen.

3. MESSERGEBNISSE - DIAGRAMME - DISKUSSION

Die Ergebnisse der Untersuchungen an den Wachstumszonen von jungen Hühnern und Hähnchen sind in Fig. 3 und Fig. 4 (Seite 30 und 31) graphisch veranschaulicht. Fig. 3 gibt die Beziehung zwischen Parathyrineinwirkung und Carboanhydraseaktivität bzw. Fig. 4 die Beziehung zwischen DBcAMP und Carboanhydraseaktivität wieder.

Wie sind diese Befunde zu deuten?
Was ist über den zugehörigen Reaktionsmechanismus daraus abzulesen?

Die Hauptfragestellung der hier vorgelegten Untersuchungen und alle Überlegungen, die dazu führten, können durch die hier beschriebenen experimentellen Befunde als positiv beantwortet angesehen werden: insofern als exogenes Parathyrin in den Zellen der Wachstumszonen von Hühnerknochen eine Steigerung der Carboanhydrase-Aktivität von temporärer Art bewirkt.

Für die weitere Analyse der durch Parathyrin bzw. DBcAMP ausgelösten Vorgänge kann auf die Betrachtung des zeitlichen Verlaufs und der Richtung der Funktionsänderung nicht verzichtet werden. Auch scheint die Größenordnung der zeitlichen Intervalle, innerhalb derer die "Störung" auf- und abgebaut wird, für die Reaktionsmechanismen charakteristisch zu sein.

Rasmussen (1974) hatte die Wirkungen von Parathyrin, Calcitonin und Vitamin D auf den lebenden Organismus untersucht und war dabei auf Einflüsse aufmerksam geworden, die vom Intestinaltrakt, insbesondere aber von den Nieren ausgingen. Im Hinblick darauf hielt er es für notwendig, den zu allgemein gefaßten Begriff der sogenannten "Calcium-Homeostase" durch speziellere auf den Wirkungsbereich hindeutende Begriffe zu ersetzen.

Niere und Intestinaltrakt erwiesen sich als besonders wichtig für die "Mineral-Homeostase", jedoch nicht im selben

Maße für die "Skelett-Homeostase". Es werden somit zwei physiologische Funktionen unterschieden, deren Wirkungssysteme nicht dieselben sind, die jedoch im Skelett als sogenannter "Haupt-Calcium-pool" (major mineral pool) eine grundlegende Gemeinsamkeit besitzen.

Von diesem Haupt-Calcium-pool ist ein "Zell-Calcium-pool" zu unterscheiden (major pool of cell calcium), der in den Mitochondrien, insbesondere in denen der Niere, gelegen ist. In diesem Zell-Calcium-pool ist der größte Teil des Calciums in Form eines tertiären Calcium-Phosphats gelagert, der in einem raschen Austauschgleichgewicht steht mit den Calcium-, Phosphat- und Wasserstoff-Ionen des EZR via Cytosol.

Es wird also unterschieden zwischen einer "Kurz-Zeit"- und einer "Lang-Zeit"-Gleichgewichtseinstellung und dementsprechend differenziert hinsichtlich der Herkunft des mobilisierten Calciums, wie auch Waite, Volkert und Kenny fanden.

Während das Skelett-Calcium nur mit einer gewissen Trägheit freigesetzt wird, was zwangsläufig eine gewisse Phasenverschiebung zwischen Stimulation und Wirkung zur Folge haben muß, scheint das Zell-Calcium jenes Calcium zu sein, welches einer Stimulation schnell und ohne Phasenverzögerung zu folgen vermag. (Letzteres wird bei den hier beschriebenen Versuchen nicht mit erfaßt.)

Die hier vorgelegten experimentellen Befunde decken sich gut mit Beobachtungen, die anderen Ortes hinsichtlich der zeitlichen Größenordnung gemacht worden sind.

Die hier beobachteten Veränderungen für das Serum-Calcium und für die Carboanhydrase-Aktivität liegen in den Zeitintervallen von 30 Minuten bis 3 Stunden; nach einer Latenzzeit von etwa einer halben Stunde - mit dem Beginn der Messungen wurde bis dahin gewartet - beginnt der Serum-Calcium-Spiegel - anfangs nur sehr langsam - zu steigen. Nach insgesamt 2 - 3 Stunden ist der Wert des Serum-Calciums wieder zum Ausgangswert zurückgekehrt (Fig. 3).

Der Funktionsverlauf der Serum-Calcium-Konzentration, Fig.3, zeigt eine enge Korrelation zum Verlauf der Carboanhydrase-Funktion; ein ursächlicher Zusammenhang könnte angezeigt sein, denn:

der Beginn des Serum-Calcium-Spiegel-Anstiegs fällt zusammen mit dem Aktivitätsmaximum der Carboanhydrase;

das Maximum des Serum-Calcium-Spiegels korreliert mit dem Maximum des Carboanhydrase-Abfalls;

in dem Augenblick, in dem das Serum-Calcium nur merklich anzusteigen beginnt, deutet sich eine Abschwächung des Carboanhydrase-Aktivitätsanstieges an, die mit dem weiteren Ansteigen des Calciumwertes in einen raschen Abfall übergeht.

Mit dem Einsetzen einer anfangs leichten, später stärker werdenden Hypercalciämie dürfte eine Gegen-Regulation eingeleitet werden,und zwar eine sehr empfindlich reagierende:

zwei Stunden nach der Parathyrin-Verabreichung scheint die Carboanhydrase-Aktivität auf den Ausgangswert zurückreguliert zu sein;

es bleibt jedoch für eine weitere Stunde eine schwache, aber merkliche Hypercalcämie bestehen,

danach deutet sich ein schwach hypocalciämischer Zustand an.

Für etwa 2,5 Stunden, nach Beginn der Störung, zeigt sich ein zweites, aber schwächeres Maximum der Serum-Calcium-funktion. Daß sich zum selben Zeitpunkt kein zweites Maximum der Carboanhydrase-Aktivität findet, könnte an der sehr viel geringeren Genauigkeit der Probenahme liegen.

Hierbei fällt der gleichzeitige und gleichgerichtete Verlauf beider Funktionen während dieses Zeitabschnittes auf, was nun aber nicht mehr als "Gegenregulation", sondern wohl eher als "Mitregulation" gedeutet werden müßte.

Eine vom Serum-Calcium ausgehende regulative Wirkung ist bisher nur für die Einwirkung auf die Parathyrin-produzie-

renden Drüsen - und zwar im Sinne einer Gegenregulation - bekannt; analoges wird für die Calcitonin-produzierenden C-Zellen angenommen, jedoch im Sinne einer Mitregulation.

Nach dem Sutherlandschen Modell intrazellulärer Reaktionen (siehe Figur 1) ist anzunehmen, daß sowohl Parathyrin als auch Calcitonin als sogenannte "first messenger" auf die Membran-gebundene Adenylat-Cyclase einwirken, was eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Folge hat.
Dieses führt wiederum, über die Aktivierung einer Proteinkinase wirkend, zur Aktivierung und vermutlichen Phosphorilierung der Carboanhydrase.

Durch Parathyrin-Injektion wird ein hyperparathyreoider Zustand erzeugt und gleichzeitig eine Carboanhydrase-Aktivitätssteigerung in der Zelle induziert. Mit dem Einsetzen der Hypercalciämie beginnt eine Gegenregulation, bei welcher die endogene Parathyrin-Sekretion inhibiert und die endogene Calcitonin-Sekretion stimuliert wird.

Da angenommen wird, daß sowohl Parathyrin als auch Calcitonin und DBcAMP an verschiedenen Zellen angreifen - Osteoklasten bzw. Osteoblasten z.B. -,kann es zu zeitlichen Verschiebungen von Regulation und Gegenregulation kommen, d.h. das exogene Parathyrin wirkt sehr schnell, während die Gegenregulation gemäß einer Calcitonin-Wirkung mit erheblicher Latenzzeit nachfolgt.

Parathyrin, endogenes und exogenes, unterliegt der Ausscheidung und dem Abbau in der Niere und darüber hinaus einer Inaktivierung in der Leber (Massry et al., Hurska et al. 1973).

Orimo (Orimo et al. 1965) konnte zeigen, daß Rattennieren-Substanz Parathyrin zu inaktivieren vermag. Die stärkste "Degradation" des Parathyrins ist in der mikrosomalen Fraktion zu finden (Martin (1969) und Melick (1969)). In-vivo Versuche bestätigten den entscheidenden Einfluß der Nieren

auf den Parathyrin-Abbau: nach Verabreichung von ^{125}I-markiertem Rinder-Parathyrin an Ratten stellte man fest, daß die meiste Radioaktivität schon nach 10 Minuten in den Nieren anzutreffen war. (Fang und Tashian (1972), Martin (1969), Melick und Martin (1969) und de Luise, Melick (1970)).

Der in Fig. 4 veranschaulichte experimentelle Befund zeigt, welchen Effekt eine intravenöse DBcAMP-Injektion auf die Carboanhydrase-Aktivität in Knochenzellen und den Serum-Calcium-Spiegel hat. Für beide Funktionen fallen die Funktionswerte während einer Stunde ab, erreichen ein Minimum und steigen dann im Verlaufe der nächsten zwei Stunden langsam wieder an. Die Funktionswerte der Carboanhydrase-Aktivität kehren nach insgesamt 2 Stunden zum Ausgangswert zurück, um weiter anzusteigen. Der Serum-Calcium-Spiegel zeigt nach 2,5 Stunden einen Nulldurchgang und steigt dann sehr langsam. Wells (Wells und Lloyd 1969) verabreichte intakten Ratten DBcAMP, tötete die Tiere zwei Stunden nach Verabreichung und untersuchte die Auswirkungen auf den Calcium-Serum-Spiegel. Er fand dabei keinen erkennbaren Effekt.

Diese Beobachtungen stehen nicht im Widerspruch zu den hier vorgelegten Befunden, denn in diesem Zeitbereich zeigt sich auch hier ein dem Ausgangswert angenäherter Wert.

An thyreoparathyreoidektomierten Ratten jedoch fanden Wells und Lloyd (1969) nach DBcAMP-Gabe (100 mg/Kg i.p.) einen eindeutigen hypercalciämischen Effekt mit einem flachen Maximum nach 4 Stunden (vergl. auch hierzu Fig. 4).

Dieser Effekt könnte besagen, daß einerseits der langsame Serum-Calcium-Anstieg in Abwesenheit der thyreoparathyreoiden Drüsen nicht auf eine Stimulation thyreoider hypercalciämisch wirkender Hormone und auch nicht auf eine Hemmung der Sekretion hypocalciämisch wirkender Hormone zurückzuführen ist.
Andererseits aber, da DBcAMP auch nach Entfernung der Nebenschilddrüsen wirksam ist, müßte der Angriffspunkt für DBcAMP außerhalb dieser Drüsen liegen.

Holke (Dissertation 1974) fand nach Injektion von DBcAMP bei Ratten und Hühnern eine Erhöhung der Carboanhydrase-Aktivität in Nierenhomogenaten im 105.000g-Überstand; keine signifikante Steigerung, aber in der mikrosomalen Fraktion 1,5 - 2,0 Stunden p.i. Ihre Ergebnisse könnten als Imitation der Parathyrin-Wirkung durch cAMP bzw. DBcAMP angesehen werden, in Übereinstimmung mit den Befunden von Wells und Lloyd. Diese Befunde würden den hier vorgelegten nicht widersprechen, da nach 2 Stunden die Carboanhydrase-Aktivität nach einem Minimum bei etwa einer Stunde p.i. wieder über den Ausgangswert angestiegen ist und die Calciumkonzentration sich dem Ausgangswert angenähert hat.

Nach den hier vorgelegten experimentellen Befunden an intakten Hühern - mit deutlichem hypocalciämischem Minimum nach ca. 1 Stunde post inject. - ist als Erklärung zu diskutieren, daß eine durch DBcAMP verursachte Calcitonin-Sekretion, die nach 2,5 bis 3 Stunden in ihren Wirkungen abgeklungen sein müßte, für diese Effekte maßgeblich ist.

Die Infusion von DBcAMP zeigte an Ratten (Rasmussen (1968)) und Hunden (Agus (1971)) und Agus et al. (1973)) eine erhöhte Calcium-Phosphat-Ausscheidung, die einer solchen nach Parathyrin-Infusion sehr ähnlich ist.

Dazu muß gesagt werden, daß deutliche Unterschiede bestehen in den Wirkungen von exogenem cAMP, DBcAMP und Parathyrin. Rasmussen (Rasmussen und Tenenhouse (1968)) sah aufgrund seiner expérimentellen Ergebnisse die Rolle des cAMPs darin, daß es die Zellmembranpermeabilität für Calcium-Ionen ändere. Dieser Schluß wurde ergänzt durch die Beobachtung, daß DBcAMP biologische Membranen sehr viel leichter passiere als cAMP u.a. und es widerstandsfähiger sei gegen die 3', 5'-Nukleotid-Phosphodiesterase.

DBcAMP erzeugt also eine erhöhte Zellmembranpermeabilität für Ca-Ionen sowie eine erhöhte renale Ca-Phosphat-Ausscheidung; seine Applikation läßt eine temporäre Hypocalciämie erwarten.

Die Parallelität des Funktionsverlaufes von Carboanhydrase-Aktivität und Serum-Calcium-Spiegel nach Applikation von DBcAMP - im Gegensatz zum anfänglichen Kurvenverlauf nach Parathyrin-Injektion - nötigt zu weiteren Überlegungen und Folgerungen. Sowie Serum-Calcium-Spiegel als auch Carboanhydrase-Aktivität verlaufen phasengleich und haben zeitlich übereinstimmend ein Minimum temporärer Art, d.h. einen zeitlich begrenzten Abfall unter den Ausgangswert.

Zwei Ereignisse hat nach Rasmussen et al. (1972) und Rasmussen et al. (1974) die Wechselwirkung zwischen Hormon und seinem Zellmembranrezeptor zur Folge:

die Aktivierung der membrangebundenen Adenylatcyclase,

den Anstieg der Calcium-Aufnahme in die Zelle.

Die Anregung der Adenylatcyclase führt zu einem Anwachsen der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die Zunahme der cytosolen Ca^{++}-Konzentration hat zur Folge, daß calciumabhängige intrazelluläre Enzyme aktiviert werden und gleichzeitig die Adenylatcyclase und andere Enzyme inhibiert werden. Die Reaktion stellt einen "negativen feed-back"-Mechanismus dar, d.h. die beiden gleichzeitig induzierten Reaktionen führen im Endeffekt zu einer gegenregulatorischen Selbstkompensierung.

Erfolgte diese Gegenregulation momentan, so könnte kein Effekt sichtbar werden. Allein aus der Tatsache, daß überhaupt ein extrazellulär sichtbarer Effekt auftritt, kann gefolgert werden, daß in diesen beiden - an sich gegenläufigen - Wirkungen nur eine reaktionskinetisch bedingte zeitliche Phasendifferenz den extrazellulären sichtbaren Effekt bestimmt.

Nun war bei der Parathyrin-Einwirkung - nach den hier vorgelegten Befunden - eine Phasendifferenz zwischen Carboanhydrase-Aktivitäts-Anstieg bzw. -Änderung und Anstieg bzw. Änderung des Serum-Calcium-Spiegels registriert worden. Dahingegen verlaufen hier beide Funktionen ohne jede Phasen-

differenz parallel-synchron-synergistisch.

Diese "Phasendifferenzen" zwischen verschiedenen Funktionsabläufen scheinen eine grundsätzlich wichtige Rolle zu spielen, und es gilt wohl zu unterscheiden, zwischen welchen Funktionen solche überhaupt und von welcher Größe und Richtung zu registrieren sind.

Die cytosole Ca^{++}-Ionen-Konzentration wird als der sogenannte "major intracellular messenger" angesehen, der über gewisse Ca^{++}-abhängige Enzyme intrazelluläre Folgereaktionen auslöst. Der (extrazelluläre) Serum-Calcium-Wert scheint eine ähnliche Funktion in Bezug auf die thyreo-parathyreoiden Drüsen zu haben.

Folglich sollte man neben dem extrazellulären Serum-Ca-Wert einen cytosolen Ca-Normalwert unterscheiden; beides wären charakteristische Ca-Ionen-Konzentrationswerte, die im zugehörigen Bereich für den momentanen Reaktionsablauf verantwortlich wären. Im statischen Gleichgewicht dürften die Calcium-Ionen-Konzentrationen sich im engsten Bereich ihrer Norm-Werte befinden; in allen anderen, nicht-statischen Zuständen stellen sich Abweichungen von diesen Norm-Werten ein, z.B. als Folge einer exogenen Störung durch Parathyrin oder DBcAMP. Diese Abweichungsvorgänge können in Dauer und Beginn sehr verschieden sein.

Hier spielt auch der Faktor mit hinein, daß im cAMP und DBcAMP zwei Substanzen zur Verfügung stehen, die fähig sind, mehr oder weniger schnell bzw. mehr oder weniger stark die Zellmembran zu passieren oder ihre Permeabilität zu verändern.

Werden nun aber Permeabilitätsunterschiede dem Betrage und der Zeit nach für möglich gehalten, so dürfen auch gewisse zeitliche Phasenverschiebungen zwischen ursächlicher "Störfunktion" (Parathyrin bzw. DBcAMP-Injektion) und verursachter "Folgefunktion" (Carboanhydrase-Aktivitätsänderung, Serum-Calcium-Schwankungen) erwartet werden. Dabei werden die ursächlichen Zusammenhänge der Funktion nicht aufgehoben,

sondern sie werden eher dadurch bestätigt. Durch die Phasenverschiebungen wird der Hinweis gegeben, daß unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten existieren und dadurch "Störungen" verschieden schnell beginnen und abklingen.

Die Calcium-Homeastasis beruht auf einem sogenannten "negative feedback" Steuerungsmechanismus, der normalerweise die Serum-Calcium-Konzentration eng korreliert an die Parathyrin-Sekretionstätigkeit der Nebenschilddrüsen.

Es wird nun von Fällen berichtet, in denen diese Korrelation nicht mehr existiert. Die Nebenschilddrüsen können unter gewissen Umständen "autonomes" Verhalten zeigen. Ihre Sekretionstätigkeit erfolgt unabhängig von der Calciumkonzentration im Serum (McPhaul et al. (1964), McIntosh et al. (1966)). Stets stand ein pathologischer Zustand, z.B. Nierenversagen, im Zusammenhang damit. (Pappenheimer et al. (1935), Stranbury et al. (1966)).

Bei Osteomalacia - mit Vitamin D_3 behandelt - kann ohne gleichzeitige Änderung der Serum-Calcium-Konzentration eine Parathyrin-Konzentrationsabnahme erfolgen. In diesem pathologischen Sonderfall besteht die Korrelation zwischen Ca-Gehalt des Serums und Parathyrin-Sekretion nicht mehr (Rasmussen et al. (1974)).

Aus diesem Befund wurde die Existenz eines neuartigen feedback-Mechanismus gefolgert (Figur 2), der zwischen Parathyrin und Calciferol bestehen soll und gleichzeitig als Ergänzung zur Parathyrin-Serum-Ca-Relation angesehen wird.

Auch diese Beobachtungen wurden bei osteomalacisch veränderten Systemen gemacht.

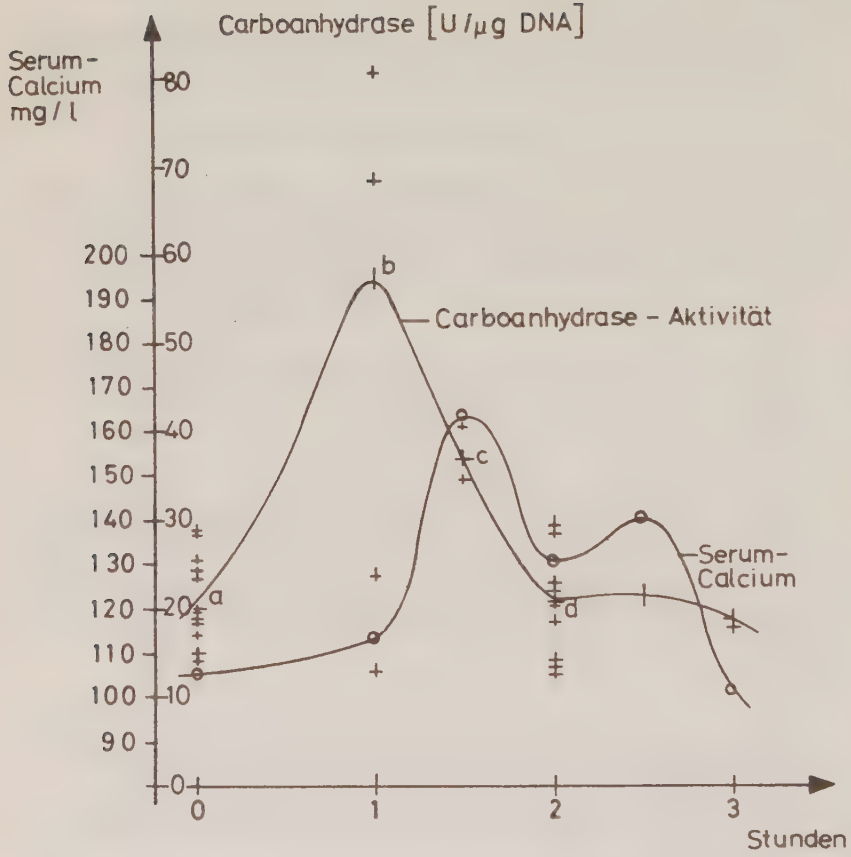


Fig. 3: Änderung von Carboanhydrase-Aktivität und Serum-Calcium-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit nach Parathyrin-Applikation.
(Zentralwertkurve) Berechnungen siehe Tabelle.

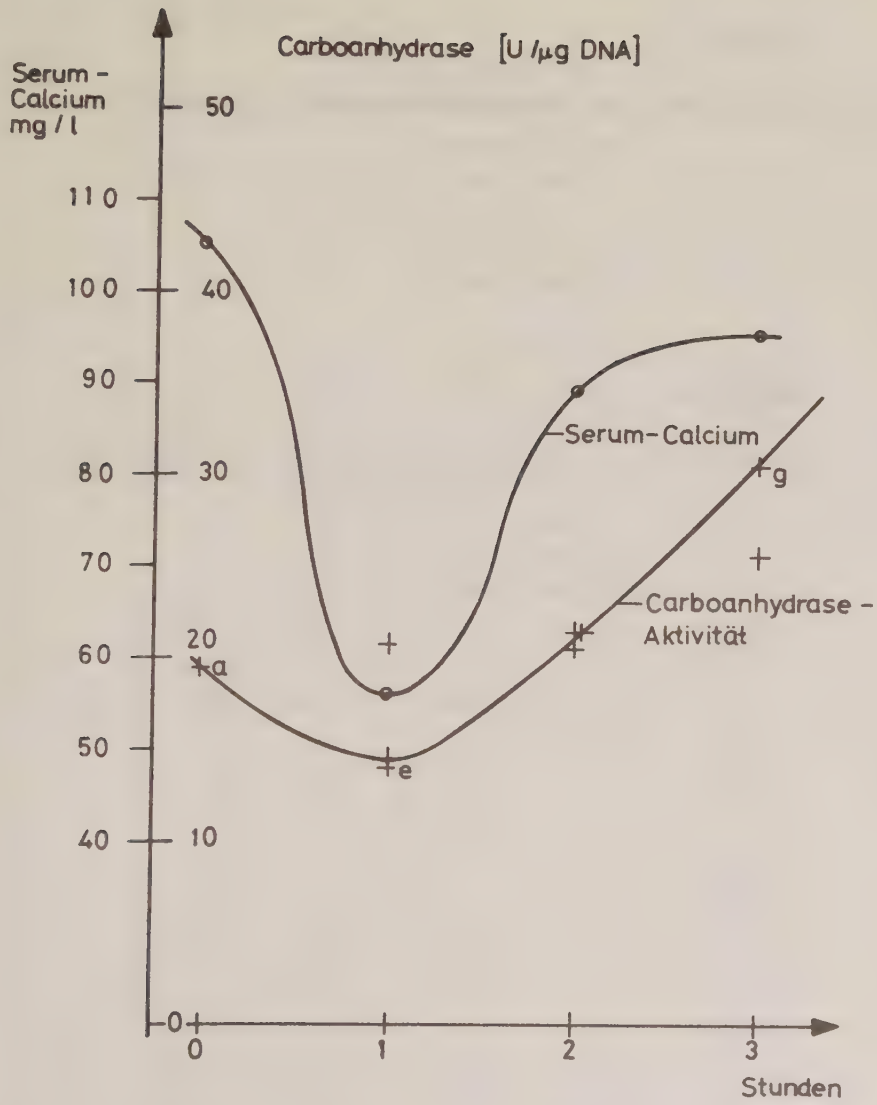


Fig. 4: Abhängigkeit der Carboanhydrase-Aktivität und der Serum-Calcium-Konzentration von der Zeit nach DBcAMP-Applikation. (Zentralwertkurve) Berechnungen siehe Tabelle.
(Punkt a entspricht dem Nullwert von Fig. 4).

Zu Fig. 4:

Tabelle der Signifikanzberechnungen für folgende Punkte:

a : b	$0,1 > p > 0.05$
b : c	$0,5 > p > 0,4$
c : d	$p < 0,01$
a : c	$p < 0,01$
b : d	$0,1 > p > 0,05$

Zu Fig. 5:

Tabelle der Signifikanzberechnungen für folgende Punkte:

a : e	$0,2 > p > 0,1$
a : g	$0,2 > p > 0,1$
e : g	$0,1 > p > 0,05$

3.2 Tabellen

Blutkorrektur-Beschreibung:

Formulierung Seite 60, letzter Absatz bei Versuchsbeschreibung

Parathyrin-Appl. vor Meßbeginn [h]	Carboan-hydrase [U]	DNA [µg]	U/µg DNA	Ca im Serum [mg/l]	ΔCa [mg/l]	Anzahl der Tiere
0	1000	50,6	19,8	105	± 0	11
1	1433	26,3	57,1	102	+ 10	5
1,5	1352	36,4	37,2	105	+ 57,5	2
2	984	47,3	20,9	116	+ 14	11
3	1168	62,5	18,7	102	- 1	2

Tabelle 1 Zentralwerttabelle für die Carboanhydrase-Aktivität nach i.v. Parathyrin-Gabe (200 Units/kg KG) und zum Zentralwert zugehörige Meßwerte von DNA-Gehalt und Serum-Calcium und Veränderungen des Serum-Calciums in Abhängigkeit von Parathyrin-Gabe und Zeit.

DB-cAMP Appl. vor Meßbeg. [h]	Carboanhydrase [U]	DNA [µg]	Carboanhydrase [U/µgDNA]	Calcium i.Serum [mg/l]	Δ Ca [mg/l]	Anzahl der Tiere
0	1000	50,6	19,8	105	± 0	11
1	972	66,0	14,7	104	- 48	3
2	1460	69,0	21,2	108	- 19	3
3	2557	84,0	30,4	98	- 2	3

Tabelle 2 Zentralwerttabelle für die Carboanhydrase-Aktivitäten nach i.v. Gabe von 100 mg DBcAMP/kg Körpergewicht mit zugehörigen Meßwerten von DNA-Gehalt und Serum-Calcium sowie Serum-Calcium-Zu- bzw. -abnahme.

Lfd.Nr.:	t_o Epi in s	t_x Epi in s	t_o Blut in s	t_x Blut in s	Gesamt-CA [U/ml]	Blut-CA [U/ml]	Epiphysen-CA [U/ml]
1	116,2	11,4	116,2	22,6	1489	6709	1000
2	122,8	14,7	122,8	14,5	2387	12099	1499
3	90,7	24,1	90,7	28,4	1791	14245	1352
4	93,1	25,9	93,1	18,8	1681	12804	987
5	129,0	17,8	119,5	11,5	2021	15106	1168
2 c	112,5	18,2	112,5	13,0	1679	12400	972
3 c	116,5	19,4	116,5	24,0	1622	6244	1460
4 c	116,5	11,8	116,5	25,0	2770	5929	2557

Tabelle 3 Carboanhydrase-Aktivitätsbestimmung der Proben. Probenauswahl entsprechend den Zentralwerten nach den Ergebnissen Carboanhydrase U/µg DNA .
Die Lfd.Nr. 1 entspricht den nicht vorbehandelten Kontrolltieren.
Die Lfd.Nr. 2 - 5 entsprechen den mit Parathormon behandelten Versuchstieren.
Die Lfd.Nr. 2c - 4c entsprechen den mit DBcAMP vorbehandelten Versuchstieren.

Lfd.Nr.:	Blut			Epiphyse			%
	$E_{K_3(Fe(CN)_6)}$	E_{KCN}	ΔE	$E_{K_3(Fe(CN)_6)}$	E_{KCN}	ΔE	Blutgehalt
1	0,121	0,231	0,110	0,002	0,006	0,004	7
2	0,155	0,292	0,137	0,009	0,014	0,005	7
3	0,296	0,523	0,219	0,007	0,0105	0,0035	3
4	0,250	0,453	0,185	0,004	0,009	0,005	5
5	0,145	0,287	0,142	0,009	0,013	0,004	5
2 c	0,220	0,392	0,172	0,076	0,107	0,031	5,7
3 c	0,206	0,366	0,160	0,062	0,075	0,013	2,6
4 c	0,211	0,370	0,159	0,071	0,059	0,015	3,6

Tabelle 4 Bestimmung des Blutgehaltes der Proben (zugehörige Werte zu den Carboanhydrase-Zentralwerten). Berechnung siehe Arbeitsmethoden.
Zuordnung der Lfd.Nr. 1 - 4 c s.o. Legende Tabelle 3.

Lfd.Nr.:	Extinktion	≙ µg	DNA [µg/100mg FG]	Methode
1	0,018	2,25	50,64	n.Dische
2	0,010	1,5	26,26	n.Dische
3	0,015	2,1	36,32	n.Dische
4	0,019	2,7	47,26	n.Dische
5	Skalenteile	= 1 DNA Lsg.		
	2,5	5,0	62,5	Le Pecq

Tabelle 5 (Extinktion gemessen gegen Reagenzienleerwert)

Bestimmung des DNA-Gehaltes, der zu den Zentralwerten zugehörigen Proben. Berechnung siehe Arbeitsmethoden.
FG = Frischgewicht der Probe.
Zuordnung der Lfd.Nr. 1 - 5 siehe Legende Tabelle 3.

Lfd. Nr.:	Skalenteile	≙ µg DNA	DNA [µg/100 mg FG]	Methode
2 c	12,5	1,1	66,0	Le Pecq
3 c	22	2,3	69,0	Le Pecq
4 c	26	2,8	84,0	Le Pecq

Tabelle 6 Bestimmung des DNA-Gehaltes der mit DBcAMP vorbehandelten Proben. (Berechnung siehe Arbeitsmethoden).

FG = Frischgewicht der Probe

Zuordnung der Lfd. Nr. 2 c - 4 c siehe Legende Tabelle 3.

4. ARBEITSVORSCHRIFTEN

4.1 Vorbehandlung der Versuchstiere

Hähnchen und Junghühner der Rasse Warren-sex-sal-link, etwa 6 - 7 Wochen alt und zwischen 500 und 1000 g schwer, wurden mit Normalkost (Fa. Zitrig) aufgezogen.

Zu Beginn jeder Versuchsreihe wird jedem Tier etwa 2 - 3 ml Blut aus der Flügelvene entnommen zur Bestimmung der Ca-Konzentration im Serum, Carboanhydrase-Aktivität im Blut und zur Hb-Bestimmung.

Sofort darauf werden jedem Versuchstier 100 mg/kg Körpergewicht DBcAMP (Fa. Boehringer, Mannheim GmbH) gelöst in 0,15 mol/l NaCl (250 mg in 5 ml) bzw. 200 Units/kg Körpergewicht Parathyrin 100 USP/ml (Para-Thormone P-20, Eli Lilly GmbH, Gießen) injiziert. Kontrolltieren wird entsprechend die gleiche Menge 0,15 mol/l Natriumchloridlösung injiziert. Nach einer Einwirkdauer von 60 bis 240 Minuten wird den Tieren wiederum 2 - 3 ml Venenblut entnommen zur Kontrollbestimmung der Serum-Ca-Konzentration und der Carboanhydraseaktivität im Blut. Gleich darauf werden die Tiere getötet und die Wachstumszone der Tibiotarsalgelenke für weitere Bestimmungen entfernt.

Die Gesamtzahl der Versuchstiere betrug 40; dabei handelt es sich, wie in den letzten Spalten der Tabellen 1 und 2 (siehe Seite 33 und Seite 34) aufgeführt, um insgesamt 11 Kontrollen und die für die unterschiedlichen Versuchsanordnungen angegebene Tierzahl.

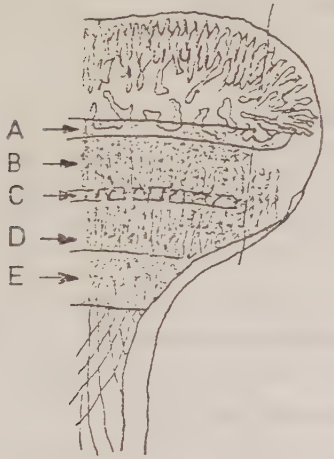
Die in den Tabellen angegebenen Werte repräsentieren den Zentralwert (siehe Seite 54) von mehreren unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchen.

Für jedes Tier wurden für Ca je 2, für Carboanhydrase und DNA je drei Einzelmessungen pro Bestimmung durchgeführt und davon der Mittelwert gebildet. Der Variationskoeffi-

zient VK, angegeben in [%], betrug hierbei für die Carboanhydrasebestimmungen 0,9 ⟨VK⟩ 2,7 , für die DNA-Bestimmungen 3,0 ⟨VK⟩ 6,4 und für die Ca-Bestimmungen 0,1 ⟨VK⟩ 2,4.

4.2 Aufarbeitung der Wachstumszonen

Um möglichst viel Ausgangsmaterial zu erhalten, zwischen 0,4 und 0,9 g pro Tier, wählten wir die größten Wachstumszonen, nämlich die der Tibiotarsal-Gelenke der Hühner. (Bei jungen Hühnern und Hähnchen lassen sich nach Entfernung der Haut und der Knorpelschicht die Wachstumszonen mit dem Skalpell relativ gut vom übrigen Knochen trennen.)



A: Knochenplatte und ein Teil des Epiphysenkernes

B: Knorpelplatte

C: Spongiosa

D: Sekundäre Spongiosa

E: Trabekel der Metaphyse

A, D und E zeigen gute Aktivität

B und C zeigen keine Aktivität

Abb. nach L.A. Cuervo (Calc. Tissue Research, 7, 220, 1971).

L.A. Cuervo et al. (1971) stellte fest, in welchen Abschnitten der Wachstumszonen Carboanhydrase-Aktivität nachzuweisen ist, indem er die proximalen Anteile der Tibia von Ratten von Hand in mehrere dünne Längsteile und diese wiederum in Untersektionen schnitt; diese Gewebeproben homogenisierte er und testete in ihnen die Carboanhydrase-Aktivität und fand dabei die oben beschriebene Verteilung.

Sodann wird das Präparat ausgewogen und mit dem 10fachen Volumen 20 mmol/l Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, der 0,5 mol/l an Saccharose und 3 mmol/l an Magnesiumchlorid ist, verdünnt. Dann wird im Eisbad für ca. 8 Minuten im Homogenisator nach Potter und Elvehjem (1936) homogenisiert. Von die-

sem Homogenat werden pro Probe 0,5 ml abgenommen und bei 40 000 g und 0 Grad Celsius für 15 Minuten zentrifugiert. Im Überstand wird dann die Carboanhydrase-Aktivität bestimmt.

Apparatur:

Servall-Ultra-Zentrifuge
Homogenisator nach Potter und Elvehjem

Lösungen:

20 mmol/l Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, der 0,5 mol/l an Saccharose und 3 mmol/l an Magnesiumchlorid ist. (85,575 g Saccharose + 1,2114 g Tris + 0,305 $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ werden in etwa 400 ml Aqua bidest gelöst und mit 1 mol/l HCl auf pH 7,4 eingestellt.)

Im Meßzylinder wird auf 500 ml aufgefüllt, der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls eingestellt.

4.3 Bestimmung der Carboanhydrase-Aktivität

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der Carboanhydrase wurde die von Roughton und Booth entwickelte chronometrische Methode, welche später von Silbur und Anderson modifiziert wurde, verwandt.

Prinzip der Bestimmung:

Die Carboanhydrase katalysiert die Hydratationsreaktion von CO_2. Dabei entstehen H^+-Ionen; diesen Vorgang kann man mit Hilfe eines Veronal-Puffers bekannter Pufferkapazität verfolgen.
Dem Veronal-Puffer wird ein Indikator (Bromthymolblau) zugesetzt, der bei bekanntem pH einen Farbumschlag zeigt. Nach überschrittener Pufferkapazität kommt es zu einer raschen pH-Abnahme. Am Farbumschlag des Indikators kann deren Zeitpunkt festgestellt werden.
Die Bestimmung wird bei 0^oC durchgeführt, da die Reaktionsgeschwindigkeit bei höherer Temparatur zu groß ist, um ohne

größeren Aufwand meßbar zu sein. Die Enzymaktivität kann nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{t_o - t_x}{t_x}$$

d.h. die Differenz der Reaktionszeiten der unkatalysierten (t_o)-und der katalysierten (t_x)- Reaktion dividiert durch die Reaktionszeit der katalysierten Reaktion ist der Enzymaktivität proportional. (Einheiten nach Meldroum und Roughton; diese geben an, um welchen Faktor die katalysierte Reaktion schneller ist, als die unkatalysierte.)

Als internationale Enzymeinheit (I-Unit) ist nach dem Report of the Commission on Enzymes (1961) diejenige Enzymmenge definiert, die bei Substratsättigung 25°C und pH-Optimum 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt.

Um vergleichbare Einheiten für die Carboanhydrase zu erhalten, definiert man diese als umgesetzte µmol CO_2 unter den benutzten Versuchsbedingungen (Temperatur 0°C, keine Enzymsättigung, sondern angegebene Co_2-Konzentration).

Körber (1964) stellte dazu folgende Rechnung an:

Die CO_2-Konzentration zu Beginn der Reaktion beträgt 24,4 µmol/ml; da 2 ml bei 0°C gesättigte CO_2-Lösung (71 µmol CO_2/ml) auf 5 ml verdünnt werden, beträgt die Pufferkapazität bis zum Indikatorumschlag 9 µmol/ml.
Die daraus resultierende mittlere CO_2-Konzentration (23,9 µmol/ml) wird mit der Geschwindigkeitskonstanten der unkatalysierten Reaktion bei 0°C k_u = 0,135 min^{-1} multipliziert.
Es ergibt sich der Substratumsatz: 3,23 µmol/min . ml Reaktionsansatz und entsprechend für den Reaktionsansatz von 5 ml 16,2 µmol/min für die unkatalysierte Reaktion.
Hieraus folgt die Vergleichsformel:

$$\frac{t_o - t_x}{t_x} \times 16{,}2 \times f = \text{"I-Unit"/ml Probe}$$

In Worten:

Meldroum und Roughton-Einheiten multipliziert mit dem oben errechneten Faktor 16,2 und einem Verdünnungsfaktor f für die Probe, der sich auf 1 ml bezieht, ergibt "internationale Einheiten", die,abweichend von der Definition, bei einer Temperatur von $0^{\circ}C$ und bei nicht optimaler Substratkonzentration ermittelt werden.

Durchführung der Bestimmung der Carboanhydrase-Aktivität:

Reagentien:

0,022 mol/l Veronal-Puffer, pH 8,15:

453 mg Veronal-Natrium werden in 50 ml warmen H_2O gelöst und mit 12 mg Veronal und 5 mg Bromthymolblau versetzt. Im Meßkolben wird auf 100 ml aufgefüllt.
Der pH-Wert wird an der Glaselektrode kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert.

Farbvergleichslösung pH 6,3:

Von obenstehender Lösung wird ein bestimmtes Volumen mit Aqua bidest. im Verhältnis 2 + 3 gemischt und mit HCl auf pH 6,3 eingestellt.

Gesättigte CO_2-Lösung:

Für etwa 30 bis 40 Minuten vor Versuchsbeginn und während der gesamten Versuchsdauer wird bei $0^{\circ}C$ bidest. H_2O mit CO_2 durchströmt.

Bestimmung von t_o, der unkatalysierten Reaktionszeit:

2,0 Veronal-Puffer + 1,0 Aqua bidest. werden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit 2,0 ml gesättigter Lösung versetzt und gemischt. Gemessen wird die Zeit von Reaktionsbeginn bis zu dem Zeitpunkt, an dem das Reaktionsgemisch die Farbe der Vergleichslösung von pH 6,3 angenommen hat.

Bestimmung von t_x, der katalysierten Reaktionszeit:

2,0 ml Veronal-Puffer pH 8,15 + 0,9 bis 0,99 ml Aqua bidest. + 0,1 bis 0,01 ml Carboanhydrase-Lösung (40.000g-Überstand des Homogenats, siehe II) werden mit 2,0 ml gesättigter CO_2-Lösung vermischt und die Zeit bis zum Farbumschlag gemessen.

Die Berechnung der Enzymeinheiten wird nach folgender Formel (Meldroum und Roughton, umgerechnet in Internationale Enzymeinheiten U, s.o.) durchgeführt.

$$\frac{t_o - t_x}{t_x} \times 16{,}2 \times f = U$$

Apparatur:

Eisbad
Reaktionsgefäß
Meßzylinder und Einleitungsrohr mit Gasfritte.

4.4 DNA-Bestimmung

4.4.1 Fluorimetrische Methode nach J.B. Le Pecq, modifiziert

0,5 ml des Epiphysenhomogenats, 50 mg FG (= Frischgewicht) in 4,50 ml Saccharose-Puffer, werden in 2,5 ml Tris/HCl-Puffer (10 µmol/l, pH 7,1; 5 µmol/l $MgCl_2$; 0,5 mol/l NaCl) suspendiert und 3 x 20 s bei 0,8 mA und im Eisbad ultrabeschallt, danach 15 min bei 0°C und 40.000g zentrifugiert.

Davon wird a) 1 ml mit DNase für ca. 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach werden etwa 0,5 ml 20 µmol/l EDTA-Lösung zugegeben und diese Lösung zentrifugiert.

b) 1 ml mit 0,5 ml 20 µmol/l EDTA angesetzt und zentrifugiert.

Von den beiden Lösungen werden zur Messung je 100 µl eingesetzt. Der Ansatz besteht aus

1 000 µl Ethidiumbromid (20 mg/l)
100 µl DNA-haltige Lösung bzw. DNase-behandelte Lösung

1 100 µl.

Die Differenz zwischen der Fluoreszenz der Lsg. a und b wird als proportional zum aktuellen DNA-Gehalt angenommen.

Gemessen wird im Zeiss Spektralphotometer PM Q II bei 580 nm, die Fluoreszenzanregung geschieht bei 365 nm im Fluoreszenzansatz ZFM4.

Prinzip dieser Bestimmung:

Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-phenyl-5-ethylphenantridiniumbromid, bekannt als Trypanicidal-Farbstoff) hat die Eigenschaft, eine Bindung mit Nucleinsäuren einzugehen.

Ethidiumbromid wird je nach helikalen Anteilen von RNA und DNA gebunden. Aus diesem Grunde wurde DNase-behandelte und -unbehandelte Lösung eingesetzt und daraus die Differenz gebildet, um den aktuellen DNA-Gehalt zu ermitteln.

Durch die Bindung von Etidiumbromid an doppelstrangige Polynucleotide wird dessen Fluoreszenz spezifisch gesteigert, und zwar um den Faktor 20.

Mit der Bindung an Nucleinsäuren verschiebt sich das Absorptionsmaximum für Ethidiumbromid zu größeren Wellenlängen. Bei bestimmten Wellenlängen ist der Absorptionskoeffizient für gebundenes Ethidiumbromid viermal so groß wie für ungebundenes Ethidiumbromid. Die Affinitätskonstante für Nucleinsäure hängt von der Ionenstärke ab.

Die Bindung von Ethidiumbromid an Nucleinsäure wird nicht beeinflußt durch die Basenzusammensetzung der Polynucleotide oder deren Molekulargewichte.

Man hat festgestellt, daß es zwei verschiedene Bindungsorte für Ethidiumbromid an Nucleinsäuren gibt:

einen fluoreszierenden und
einen elektrostatischen Bindungsort.

Das Maximum des Ethidiumbromid-Emissionsspektrums liegt bei 590 - 600 nm, der genaue Wert hängt von dem verwandten Photomultiplier ab.

Der größte Fluoreszenzzuwachs von freiem Ethidiumbromid zu gebundenem Ethidiumbromid liegt bei Wellenlängen von 365 nm für die Fluoreszenzanregung.

Störende Faktoren der Versuchsanordnung:

Organische Substanzen in der Lösung.

Detergenzien, die Ethidiumbromid für Photodegradation sensibilieren können.

Unterschiedliche Temperaturen.

Unterschiedliche Aufarbeitungsmethoden.

Jegliche Schwermetalle (EDTA).

Wenn Ethidiumbromid in genügender Konzentration zugegeben wird, findet man eine lineare Relation zwischen Fluoreszenz und Nucleinsäurekonzentration.

Aufstellen einer Standardkurve:

Aufstellen einer Standardkurve:

Ansetzen von DNA-haltiger Lösung, die von 1,0 - 10 µg DNA enthält.

Ansatzverdünnung, wie oben beschrieben, mit Ethidiumbromid. Messung der Emissionsänderung bei 600 nm nach Fluoreszenzanregung bei 365 nm. Bestimmung des DNA-Gehaltes der Proben nach Ablesen aus der Standardkurve.

Reagenzien und Geräte:

Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-phenyl-5-ethylphenanthridiniumbromid)

Tris/HCl-Sucrose-Puffer s. Kap. 4.2

Tris/HCl-Puffer (10 mmol/l pH 7,1 + 5 mmol/l $MgCl_2$)

DNA (Kälberthymus-DNA von Fa. Serva)

DNase von Fa. Worthingron Biochemical Corporation

Zeiss Spektralphotometer PM Q II mit Fluoreszenz-Ansatz ZFM

Ultraschall-Disintegrator Type MSE
Ultrazentrifuge Type Beckmann L-50

4.4.2 Methode nach Schmidt, Tannhauser und Schneider, modifiziert nach Volklin und Cohn (1957)

1. Abtrennung der DNA von anderen Gewebebestandteilen.

Durchführung:

1,0 ml 20 %iges Gewebshomogenat werden in einem Zentrifugenglas mit 2,5 ml kalter 100 g/l Trichloressigsäure versetzt, gut vermischt und zentrifugiert.
Der Ruckstand wird mit 100 g/l Trichloressigsäure gewaschen und dann in 1,0 ml H_2O suspendiert.

Es werden 4,0 ml Alkohol zugesetzt, zentrifugiert und der Rückstand einmal mit Alkohol und dreimal mit einem Alkohol-Äther-Gemisch (Volumina 3 + 1) gewaschen. Auf diese Weise lassen sich die Lipide abtrennen.

Den Rückstand inkubiert man für 16 - 20 Stunden bei 37°C mit 1,0 mol/l KOH im Brutschrank, und zwar im Verhältnis 1,0 ml KOH : 100 mg Frischgewebe. Hierbei geht der Rückstand in Lösung.

Nach Ablauf der 20 Stunden wird mit 6,0 mol/l HCl neutralisiert (Indikatorpapier). Setzt man jetzt 1 : 1 Volumenanteile 50 g/l Trichloressigsäure zu, fallen DNA und Proteine aus. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und gewaschen.

Der so erhaltene Niederschlag wird mit 5,0 ml 50 g/l Trichloressigsäure 15 Minuten bei 90°C im Wasserbad erhitzt, abgekühlt und zentrifugiert.

In der Lösung finden wir die Produkte der Hydrolyse von DNA. Der Rückstand wird noch einmal mit 2,5 ml 50 g/l Trichloressigsäure gewaschen und die Zentrifugate werden vereinigt.

Dann wird auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt und die Bestimmung von Desoxypentose in aliquoten Teilen durchgeführt.

Prinzip:

Läßt man auf ein Gewebegemisch kalte Trichloressigsäure einwirken, so erhält man eine Fällung von Nukleinsäuren, Phospholipiden und Proteinen. Anorganisches Phosphat und niedermolekulare Verbindungen bleiben in Lösung.

Durch ein Alkohol-Äther-Gemisch erfolgt die Extraktion von Phospholipiden.
Aufgrund der Alkaliresistenz von DNA wird durch Inkubation mit KOH die DNA von der RNA (diese wird zu säurelöslichen Mononukleotiden hydrolysiert) getrennt. Hierbei werden auch die Phosphatreste aus den Phosphoproteiden abgespalten. Setzt man jetzt Säure zu, fällt DNA und phosphatfreies Protein. Der Niederschlag wird mit heißer Trichloressigsäure versetzt. Hierbei entstehen aus DNA Desoxyribose, Phosphat, säurelösliche Basen.

Im Rückstand bleibt Protein.

Reagenzien und Apparaturen:

50 g/l Trichloressigsäure

100 g/l Trichloressigsäure

1 mol/l KOH

6 mol/l HCl

95 % Ethylalkohol

Alkohol - Äther, 3 + 1
Zentrifuge mit Spitzgläsern
Indikatorpapier

2. Bestimmung der Desoxyribose nach Dische (1930)

Prinzip:

Aus 2-Desoxypentosen und ihren Glykosiden entsteht beim Erhitzen mit Diphenylamin in Eisessig-Schwefelsäure ein blauer Farbstoff, der photometrisch bestimmt werden kann.

Durchführung:

1,0 ml der Probe - sollte ca. 500-50 µg Desoxyribose enthalten - wird mit 2,5 ml Reagenz 5 Minuten in siedendem Wasser erhitzt. Nach dem Abkühlen wird gegen den Reagenzien-Leerwert photometrisch gemessen.

Reagenzien und Apparatur:

1,0 Diphenylamin wird in ca. 50 ml Eisessig gelöst und mit 2,0 ml Schwefelsäure (D = 1,84) versetzt.
Dann wird mit Eisessig auf 100 ml im Erlenmeyerkolben aufgefüllt.
Wasserbad.
Photometer Eppendorf, Filter Hg 546 nm
2 Küvetten 1 cm Schichtdicke.

Auswertung:

mit Hilfe einer Standardkurve für den Bereich von 20 - 200µg Desoxyribose.
0,1 - 1,0 ml einer 200 mg/l Lösung.
DNA enthält ca. 40 % Desoxyribose; man muß daher die der Standardkurve entnommenen Analysewerte mit 2,5 multiplizieren.

4.5 Bestimmung des Blutgehaltes der Probe und Blutkorrektur für Carboanhydrase-Gehalt (Holzer, Seidlmeyer und Kiese (1956) modifiziert)

Um eventuelle Verfälschungen der Enzymaktivitäten durch im Homogenat vorhandene Blutcarboanhydrase auszuschließen, wurde der Hb-Gehalt des Homogenates sowie Hb- und Carboan-

hydrase-Gehalt des Blutes bestimmt. Der Quotient aus Hb-Gehalt des Homogenates und dem des Blutes ergibt den prozentualen Blutgehalt des Knochenhomogenates.
Durch Bestimmung des Carboanhydrasegehaltes des Blutes kann der Anteil an Blutcarboanhydrase bestimmt werden und von der Gesamt-Carboanhydrase des Knochenhomogenates substrahiert werden.

Prinzip der Blutbestimmung:

Durch Zusatz von Ferricyanid wird Hämoglobin zu Hämiglobin oxidiert, das dann durch Cyanid-Zusatz eine stabile Hämiglobin-Cyanid-Verbindung bildet. Bei 546 nm kommt es zu einer Absorptionszunahme durch den Cyanid-Zusatz, und wir finden bei dieser Wellenlänge ein maximales Differenz-Spektrum der beiden Verbindungen.

Durch Bestimmung der Extinktionsdifferenz von Organproben und Vergleich mit denen von Blutproben bekannter Verdünnungen erhält man den prozentualen Blutgehalt der Organproben.

Vorbereitung der Probe:

Herstellung vom Hämolysat: Verhältnis von Blut zu 1,25 g/l NaCl-Lösung: 1 : 125. Das Homogenat der Organprobe wird ebenfalls mit 1,25 g/l NaCl versetzt, und zwar im Verhältnis 1 : 25. Beide Ansätze wurden ca. 20 Minuten stehen gelassen, dann - um klare Lösungen zu erhalten - 100 Minuten bei 100 000 g und 0°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert und der Überstand zur Bestimmung verwandt.

Reaktionsansatz:

2,5 ml der Testlösung und 0,5 ml Triethanolamin-Puffer werden in einer 1-cm-Küvette vermischt und mit 10 µl Ferricyanid-Lösung versetzt und wiederum gut gemischt. Nach etwa 5 Minuten mißt man bei 546 nm die Extinktion. Danach fügt man 10 µl 1 mol/l NaCN-Lösung hinzu und mißt nach gutem Umrühren wiederum die Extinktion.
Gemessen wird gegen den Reagenzien-Leerwert.

Formel zur Berechnung:

$$\frac{E_p \times \text{Verd. Faktor}}{E_{Blut} \times \text{Verd. Faktor}} \times 100 = \text{\% Blutgehalt}$$

E = Extinktion nach Zugabe von NaCN minus Extinktion nach Zugabe von $K_3[Fe(CN)_6]$

E_p = entsprechender Wert für das Organhomogenat

Verd. Faktor = Verdünnungsfaktor 125 bzw. 25

Apparaturen und Reagenzien:

Photometer Eppendorf, Filter Hg 546 nm

Küvetten 1 cm Schichtdicke

Ultrazentrifuge Servall

1,25 g/l NaCl-Lösung

0,2 mol/l Triethanolamin/HCl-Puffer, pH 7,5

10 g/l $K_3[Fe(CN)_6]$

1,0 mol/l NaCN

4.6 Bestimmung der Serum-Calcium-Konzentration

Methode:

Titrationsmethode mit EDTA und dem Indikator Murexid (SIEGMUND und DULCE 1960), (QUICKER und DULCE 1968)

Prinzip:

Calcium und Murexid bilden einen Chelatkomplex von violetter Farbe. Bei Zugabe von EDTA wird Calcium aus der Verbindung herausgelöst und stöchiometrisch (1 : 1) als Chelat an EDTA gebunden. Das calciumfreie Murexid ist rot. Der Umschlag kann bei 480 nm am Photometer ermittelt werden.

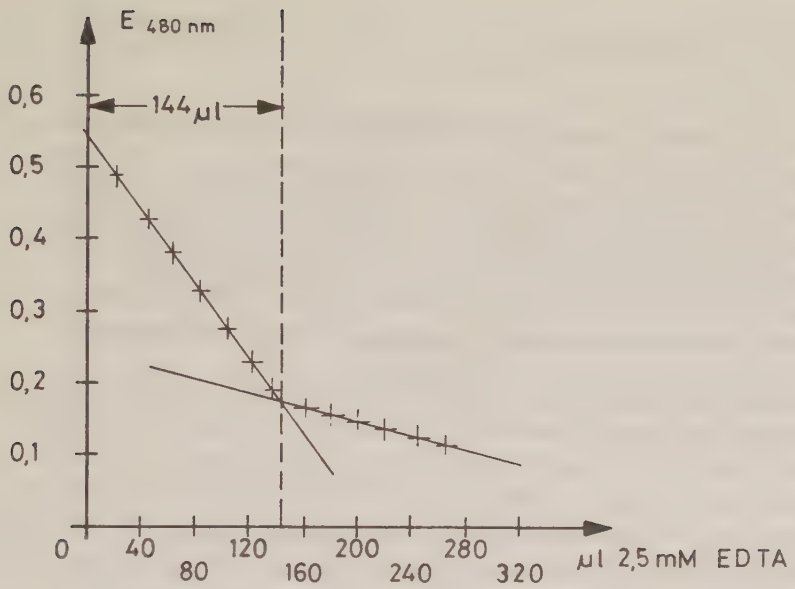


Fig. 6:

Komplexometrische Calcium-Titration mit photometrischer Endpunktbestimmung.

Der Umschlagspunkt wird graphisch bestimmt. Man trägt in eine Titrationskurve Extinktionsänderung gegen verbrauchte µl 2,5 mmol/l EDTA ein.

Durchführung:

Frisches, heparinisiertes Venenblut wird in Polyäthylenröhrchen bei 3600 g 10 Minuten lang zentrifugiert und das Serum abgehebert.

Folgender Reaktionsansatz:

9,5 ml Aqua bidest.
2 ml 1 mol/l NaOH

0,3 ml Murexidlösung

100 ul Serum

wird in einer 4-cm-Küvette angesetzt und sorgfältig durchgemischt. Dann erfolgt die Titration mit 2,5 mmol/l EDTA. Nach Zugabe von jeweils 20 µl (etwa alle 20 s) und Einmischen wird die Extinktion bei 480 nm (Cd-Lampe) gemessen. Das wird fortgesetzt, bis sich die Extinktionswerte nur noch unwesentlich ändern. Korrektur zum 0- und 100-Punkt wird gegen einen grünen Farbstandardfilter vorgenommen.

Eichwerte werden mit einer 2,5 mmol/l $CaCl_2$-Lösung aufgestellt und durch wiederholte Titration der Reagenzienleerwert ermittelt. Bei dieser Messung erscheinen im Diagramm (Extinktion gegen verbrauchte EDTA-Lösung in µl) zwei Geraden, die im stumpfen Winkel aufeinandertreffen. Der Scheitel des Winkels entspricht dem Umschlagspunkt und zeigt an, wieviel µl EDTA-Lösung verbraucht wurde und wieviel Calcium dementsprechend in der Lösung enthalten ist. Die zweite Gerade entsteht durch die Extinktionsabnahme aufgrund der Verdünnung mit dem Titrationsmittel.

Berechnung:

Verbrauchte µl 2,5 mmol/l EDTA-Lösung, dividiert durch 100, ergeben die Calcium-Konzentration in mg/l Plasma.

4.7 Zentralwert und Signifikanzberechnungen

Literatur: E. Weber - Grundriß der biologischen Statistik, Jena 1948

Sämtliche nachfolgenden Diagramme und Tabellen setzen sich aus Zentralwerten zusammen.

Der Zentralwert (ZW) findet häufig Verwendung in der Pharmakologie. Er wird dann angewendet, wenn nur begrenztes Tiermaterial - wie auch bei unseren Versuchen; jedes Tier mußte für die Bestimmung der Knochen-Carboanhydrase getötet werden - zur Verfügung steht und mit biologisch intaktem Tier-

material gearbeitet wird. Ein extremer Wert würde den arithmetischen Mittelwert in seinem Ergebnis stark beeinflussen.

Zur Definition des Zentralwertes:

Der Zentralwert ist derjenige Wert in der nach Größe geordneten Reihe, welcher die mittelste Stellung einnimmt. Er repräsentiert nicht den exakten Zahlenwert der einzelnen umliegenden Werte, sondern nur ihre Größenordnung.

Geometrisch ist der Zentralwert der Fußpunkt derjenigen Ordinate, die die Häufigkeitsfläche in zwei gleiche Teile teilt.

Signifikanzberechnungen:

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe der Student-Verteilung (t) überprüft. Sie wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2}}$$

Hierin bedeuten M_1 bzw. M_2 die Mittelwerte und ε_1 bzw. ε_2 die zugehörigen mittleren Fehler.

Die Signifikanzschranken der Student-Verteilung wurden dann aus Tabellen (Documenta Geigy) entnommen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Exogenes Parathyrin erhöht die Carboanhydrase-Aktivität in Knochen von jungen Hühnern oder Hähnchen.

Die Carboanhydrase-Aktivitätssteigerung ist nur von temporärer Art, zeitlich auf etwa 2 Stunden begrenzt.

Ihre Funktion zeigt einen charakteristischen Verlauf mit einem Maximum nach etwa 1 Stunde post inj., wobei der Höchstwert um den Faktor 2,5 - 3 über dem Ausgangswert liegt.

Exogenes Parathyrin stimuliert eine Hypercaliämie, deren zeitlicher Funktionsverlauf dem der Carboanhydrase gleicht und mit einer gewissen Phasenverzögerung von einer halben Stunde folgt.

Die Korrelation zwischen Hypercalciämie und Carboanhydrase-Aktivitätssteigerung wird diskutiert. Die Hypercalciämie wird in ihrem zeitlichen Änderungsverhalten als Ausdruck einer sogenannten Skelett-Homeostase - im Sinne Rasmussen - gedeutet.

DBcAMP erzeugt eine temporäre Hypocalciämie und eine anlog, synergistisch verlaufende Abnahme der Carboanhydrase-Aktivität.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Agus, Z. S., Puschett, J. B., Senesky, D., Goldberg, M., J. Clin.Invest. 50, 617 - 626, 1971.

"Mode of action of parathyroid hormone and cAMP on renal tubular phosphate reabsorption in kidney".

Agus, Z. S., Gardner, L. B., Beck, L. H., Goldberg, M., Amer. J. Physiol. 224, 1143 - 1148, 1973.

"Effects of parathyroid hormone on renal tubular reabsorption of calcium, sodium and phosphate".

Arey, L. B., Amer. J. Anat. 26, 315, 1920.

"The origin, growth and fate of osteoclasts and their relation to bone resorption".

Barnicot, N.,Amer. J. Anat. 82, 233, 1948.

"The local action of the parathyroid and other tissues on bone in intercerebral grafts".

Bauditz, W., Siegmund, P., Klin. Wschr. 39, 1220, 1960.

"Über die Hemmwirkung des Thiocyanats auf den Plasma-Calcium-Anstieg nach Parathormon".

Berliner, R. W., Kennedy jr., T. J., Orloff, J., Amer. J. Med. 2, 274, 1951.

"Relationship between acidification of the urine and potassium metabolism".

Bingham, P. J., Brazell, J. A., Owen, M. J., Endocrinology 45, 387 - 400, 1969.

"The effect of parathyroid extract on cellular activity and plasma-calcium-levels in-vivo".

Borle, A. B., New York, Academic Press, 1971 p. 151, Nichols, G. jr., Wasserman, R. A.

"Calcium transport in kidney cells and its regulation, cellular mechanism for calcium transfer and homeostasis".

Chase, L. R., Aurbach, G. D., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, 518, 1967

"Parathyroid function and the renal excretion of 3-5-adenylic acid".

Coleman, J. E., J. Biolog. Chemistry 242, 5212-52-19, 1967.
"Mechanism of action of carbonic anhydrase".

Collip, J. B., J. Biol. Chem. 63, 395, 1925.
"The extraction of a parathyroid hormone, which will prevent or control parathyroid tetany and which regulates the level of blood calcium".

Cretin, A., Presse med. 59, 1240, 1951.
(zit. nach Dulce, Siegmund, 1960)

Davenport, H. W., Fisher, R. B., J. Physiol. (London) 94, 16, 1939.
"Carbonic anhydrase in the gastro-intestinal mucosa".

Davenport, H. W., J. Physiol. (London) 97, 32, 1939.
"Gastric carbonic anhydrase".

Davenport, H. W., J. Physiol. (London) 129, 505, 1940.
"The inhibition of carbonic anhydrase and of gastric acid secretion by thiocyanate".

Davenport, H. W., Wilhelmi, A. E., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 48, 53, 1941.
"Renal Carbonic Anhydrase".

Dietsch, P., Dissertation, Berlin 1974.
"Untersuchungen über die Wirkungen von biogenen Phosphatverbindungen auf die Funktion von Proteinen am Beispiel des 2,3-Diphospho-glycerats und Adenosin-3-5-Mono-Phosphats".

Dietsch, P., Holke, M., Pochhammer, C., Siegmund, P. R. (Hamburg 1976)

Dulce, H. J., Siegmund, P., Zs. f. Physiol. Chem. 320, 160 - 162, 1960.
"Zur Biochemie der Knochenauflösung: II"
"Der Einfluß von Diamox auf das Plasma-Calcium östron-behandelter Hähne".

Dulce, H. J., Siegmund, P., Körber, F., Schütte, E., Zs. f. Physiol. Chemie 320, 163 - 167. 1960.

"Zur Biochemie der Knochenauflösung III"

"Über das Vorkommen von Carbo-Anhydrase in Knochen".

Fang, V. S., Tashian, A.H. jr., Endocrinology 90, 1177-1184, 1972.

"Studies of the role of the liver in the metabolism of parathyroid hormone:
I. Effects of partial hepatectomy and incubation of the hormone with tissue homogenates".

Feldberg, W., Keilin, D., Mann, T., Nature 146, 651, 1940.

"Activity of carbonic anhydrase in relation to gastric secretion".

Fujita, T., Orimo, H., Ohata, M. Yoshikawa, M., Maruyama,M., Endocrinology 86, 42, 1970.

"Enzymatic inactivation of parathyroid hormone by a rat kidney homogenate".

Hancox, N. M., Bourne, G. H.,

"The Biochemistry and Physiology of Bone", S. 229, Academic Press, New York 1956.

Heersche, J. N. M., Aurbach, G. D., Israel J. Med. Sci. 7, 344 - 346, 1971.

"Mode of action of dibutyryl-cyclic-AMP on bone".

Höber, R., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 49, 87, 1942.

"Effect of some sulfonamides on renal secretion"

Hoffmeister, W,. Krück, F., Klin. Wschr. 32, 106, 1954.

"Über den Wirkungsmechanismus des Kalium-Thiocyanats als Erklärung des depressorischen Effektes beim Hochdruck".

Holke, M. E., Siegmund, P., Abstr. Commun. 7th Meet. Europ. Biochem. Soc. p. 252, 1971.

"Enhancement of renal carbonic anhydrase activity by parathyroid hormone".

Holke, M. E., Dissertation, Berlin 1974.

"Die Wirkungen von Parathormon auf die Carbo-Anhydrase-Aktivität in der Niere".

Howship, J., 1820 (zitiert nach Kölliker, A. v. 1873)

Hurska, K., Kopelman, R., Rutherford, W.E., Klahr, S., Slatopolski, E., Proc.Amer.Soc.Nephrol. 6, 50,1973.
"Parathyroid hormone (PTH) metabolism in normal and uremic dogs".

Jande, S., Zs. f. Zellforschg. 130, 463 - 470, 1972.
"Effects of parathormone on osteocytes and their surrounding bone matrix: an electron-microscopic study".

Janowitz, H. D., Colcher, H., Hollander, F., Amer.J.Physiol. 171, 325, 1952
"Inhibition of gastric secretion of acids in dogs by carbonic-anhydrase-inhibitor: 2-acetylamino-1.3.4-thiodiazole-5-sulfonamide"

Johnston, C.C.jr., Deiss, W.P. jr., Endocrinology 78, 1139, 1966

Kölliker, A. v., 1873, Leipzig.
"Die normale Resorption des Knochengewebes und ihre Bedeutung für die Entstehung der typischen Knochenformen".

Körber, F., Dissertation, Berlin 1964
"Der Carbo-Anhydrase-Gehalt von Knochenzellen und seine mögliche physiologische Bedeutung".

Lindskog, S., Malstrom, G.B., J.Biol.Chem. 237, 1129-1137, 1962.
"Metal Binding and Catalytic Activity in Bovine Carbonic Anhydrase".

Lipkin, D. et al., J.Amer.Chem.Soc. 81, 6075, 6198, 1959 (zit. n. Dietsch: 1974)

Loven: 1863 (zitiert nach Kölliker, A. v. 1873)

Luise, de M., Martin, T. J., Melick, R. A., J. Endocrinol. 48, 173 - 179, 1970.
"Tissue distribution of calcitonin in the rat; comparison with parathyroid hormone".

Lutwak-Mann, C., Adams, C.E., Endocrinology 13, 26, 1969.
"Carbonic-anhydrase in the female reproductive tract;occurence, distribution and hormonal dependence".

Martin, T. J., Melick, R. A., de Luise, M., Clin.Sci. 37, 137 - 142, 1969.

"The effect of nephrectomy on the metabolism of labelled parathyroid hormone".

Martin, T. J., Melick, R. A., de Luise, M., Biochem.J. 111, 509 - 514, 1969.

"Metabolism of parathyroid hormone" degradation of ^{125}J-labelled hormone by a kidney enzyme".

Massry, S. G., Coburn, J. W., Friedler, R. M., Kurokawa, K., Singer, F. R., Nephron 15, 197 - 222, 1975.

"Relationship between the kidney and parathyroid hormone".

Matthews, J. L., Martin, J. H., Collins, E. J., Calcif.Tissue Res.Suppl. 4, 37 - 38, 1970.

"Intracellular calcium in epithelial, cartilage and bone cells"

Matthews, J. L., Martin, J. H., Amer. J. Med. 50, 589 - 597, 1971.

"Intracellular transport of calcium and its relationship to homeostasis and mineralization".

McIntosh, D. A., Peterson, E. W., Mc Phaul, J.J., Ann.intern. Med. 65, 900 - 907, 1966.

"Autonomy of parathyroid function after renal homotransplantation".

McPhaul, J. J., McIntosh, D. A., Hammond, W. S., Park, O.K., New Engl.J.Med. 271, 1342-1345, 1964.

"Autonomous secondary (renal) parathyroid hyperplasia".

Meldrum, N. U., Roughton, F.J.W., J. Physiol. 80, 113 - 142, 1933.

"Carbonic anhydrase, its preparation and properties".

Melick, R. A., Martin, T. J., Clin.Sci. 37, 667 - 674,1969.

"Parathyroid hormone metabolism in man: effect of nephrectomy".

Minkin, C., Jennings, J. M., Science 176, 1031, 1972.

"Carbonic anhydrase and bone remodeling: sulfonamide inhibition in organ culture".

Mueller, W. J., Paper Nr. 4465, 1973.
"Journal Series of the Pennsylvania Agricultural Experiment Station".

Orimo, H., Fujita, T., Mrii, H. Nakao, K., Endocrinology 76, 255 - 258, 1965.
"Inactivation in-vitro of parathyroid hormone activity by kidney slices".

Pappenheimer, A. M., Wilens, S. L., Amer. J. Path. 11, 73 - 91, 1935.
"Enlargement of the parathyroid glands in renal disease".

Pitts, R. F., Alexander, R. S., Amer. J. Physiol. 144, 239, 1945.
"The nature of the renal tubular mechanism for acidifying the urine".

Pochhammer, C., Gamer, A., Dietsch, P., Siegmund, P.R. (Hamburg 1976),
"Action of Parathyroid Hormone on the Activity of Carbonic Anhydrase in Bone Cells".

Pocker, Y., Meany, J. E., Biochemistry 4, 2534, 1965.
"The catalytic versality of erythrocyte carbonic anhydrase, I. Kinetic studies of the enzymecatalyzed hydration of acetaldehyde".

Rasmussen, H., Bordier, Ph., Kurokowa, K., Nagato, N., Ogata, E., Amer. J. Med. 56, 751 - 758, 1974.
"Hormonal Control of Skeletal and Mineral Homeostasis".

Rasmussen, H., Goodman, D.B.P., Tenenhouse, A., CRC Crit. Rev. Biochem. 1, 95, 1972.
"The role of cyclic-AMP and calcium in cell-activation".

Rasmussen, H., Kurokowa, K., Mason, J., Goodman, D.B.P., Excerpta Medica 1972.
"Cyclic-AMP, calcium and cell-activation".

Rasmussen, H., Pechet, M. M. Fast, D. J., Clin. Invest. 47, 1843, 1968.
(zit. nach Wells, Lloyd 1969)

Rasmussen, H., Amer. J. Med. 50, 567, 1971.
"Ionic and hormonal control of homeostasis".

Rasmussen, H., Tenenhouse, A., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 59 1364 - 1370, 1968.
"Cyclic-AMP, calcium-ions and membranes".

Robin, C., J. Anat. (Paris) 1, 88, 1864.
"Note sur les elements anatomiques appellés: myeloplaxes".

Robin, C., C. R. Soc. Biol. 1, 149, 1849.
"Sur l'existence de deux espèces nouvelles d'élements anatomiques qui se trouve dans le canal medullaire des os".

Roughton, F. J. W., Physiol. Rev. 15, 241, 1935.
"Recent work on carbon dioxide transport in the blood".

Rosen, S., Histochemical Journal 4, 35, 1972.
"Localization of carbonic anhydrase activity in the vertebrate nephron".

Siegmund, P., Dulce, H., Zs. f. Physiol. Chem. 320, 149 - 159, 1960.
"Zur Biochemie der Knochenauflösung I".
"Einfluß des Carbo-Anhydrase-Inhibitors: Diamox: 2-acetamino-1.3.4-thiodiazol-sulfonamid-5 auf den Calcium-Stoffwechsel von Legehennen".

Siegmund, P., Bauditz, W., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharm. 251, 288 - 294, 1965.
"Die Wirkung von Acetazolamid auf den Anstieg der Plasma-Calcium-Werte nach Parathormon".

Simasaki, M., Yagi, T., Dent. Bull. Osaka Univ. 1, 89, 1960.

Stahl, P. D., Kenny, A. D., Endocrinology 85, 161, 1969.

Steinberg, J. Nichols, G. jr., J. Endocrinology 49, 493 - 506, 1971.
"Differential stimulation by parathyroid hormone of bone and kidney ribonucleic acid synthesis".

Sutherland, E. W., Robinson, G. a., Pharmacolog. Rev. 18, 145, 1966. Science 177, 401, 1972.
"Studies of the mechanism of hormon action".

Talmage, R. V., Elliot, J. R., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 99, 306, 1958.

Talmage, R. V., Munson, P. L., Excerpta Medica 1972, pp. 560
"Calcium, parathyroid hormone and the calcitonins".

Tashian, R. E., Plato, C. C., Shows, T. B., Science 140, 53, 1963
(zit. nach Coleman 1967)

Vajda, F. J. E., Martin, T. J., Melick, R. A., Endocrinology 84, 162 - 164, 1969.
"Destruction of bovine parathyroid hormone labelled with ^{131}I by a rat kidney tissue".

Waite, L. C., Kenny, A. D., Pharmacologist 11, 252, 1969.

Waite, L. C., Volkert, W. A., Kenny, A. D., Endocrinology 87, 1129, 1970.
"Inhibition of Bone Resorption by Acetazolamide in the Rat".

Wells, H., Lloyd, W. aus: "Parathyroid-Hormone and Thyrocalcitonin" (eds: Talmage, R. V., Beranger,L.F.)
"Possible involvement of cAMP in the actions of thyrocalcitonin and parathyroid hormone", (1968) I.

Wells, H. Lloyd, W., Endocrinology 84, 861 - 867, 1969.
"Hypercalcemic and hypophosphatemic effects of DBcAMP in rats after parathyroidectomy".

Weidenreich, F., "Hdb. d. mikrosk. Anatomie des Menschen", Bd. II 2, S. 465. Springer, Berlin 1930.

Zull, J. E., Repke, D. W., J. Biol. Chem. 247, 2195 - 2199, 1972.
"The tissue localization of tritiated parathyroid hormone in thyroparathyroidectomized rats".

L e b e n s l a u f

Am 12. Juni 1947 wurde ich, Annette Gamer (geb. Braunsfurth), als Tochter des Universitätsprofessors Günter Braunsfurth und dessen Ehefrau Minnie geb. Deppe in Detmold (NRW) geboren.

Von 1953 - 1957 besuchte ich die Volksschule in Hiddesen bei Detmold; von 1957 - 1966 das Neusprachliche Mädchengymnasium in Detmold, wo ich am 16. Februar 1966 die Reifeprüfung ablegte.

1966 im Sommersemester wurde ich an der Freien Universität Berlin zum Studium der Medizin zugelassen, 1969 absolvierte ich hier die ärztliche Vorprüfung und am 17. Februar 1973 das Staatsexamen. Anschliessend arbeitete ich erst als Studentische Hilfskraft, dann als Medizinalassistentin im Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin. Den klinischen Teil meiner MA-Zeit absolvierte ich im Städtischen Humboldtkrankenhaus Berlin-Reinickendorf (1. September 1974 bis April 1975). Am 1.5.1975 erhielt ich meine Approbation als Arzt. Nach einer dreimonatigen Pause nahm ich im selben Hause meine Arbeit als Assistenzärztin auf der Chirurgischen Abteilung auf.